

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

**MODEL PEYNİRDE PEYNİR BULAMACI İLAVESİNİN
PROTEOLİZ VE BİOAKTİF PEPTİT OLUŞUMUNA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Osman Seracettin BORAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU

MART 2021

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

**MODEL PEYNİRDE PEYNİR BULAMACI İLAVESİNİN
PROTEOLİZ VE BİOAKTİF PEPTİT OLUŞUMUNA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Osman Seracettin BORAN
(D361220002)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU

MART 2021

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez konumun seçiminde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana yardımcı olan, deneyimlerinden yararlandığım hocam Sayın Prof.Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU'na sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Hayata hep ümitle bakma sebebim, sevdiğim insanlar annem, babam, kardeşlerim, eşim ve çocuklarım Emir Kıvanç, Elif Buğlem ve Ömer Necmettin'e şükranlarımı sunarım.

Araştırma sırasında kullanılan Konya Küflü Peynirlerin tedarikini sağlayan Konya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Kontrol Şube Müdürlüğünde görevli meslektaşım Ahmet GÜLEÇ Beye,

Ayrıca araştırmalarım süresince yakın ilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyelerine, özellikle doktora öğrencileri Sevil ERGÜL, Yasemin GÖKÇE ve Hilal KANMAZ'a ve Mayasan Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. Doğu Anadolu Bölge Sorumlusu Gıda Mühendisi Murat GÖKMEN'e teşekkürü bir borç olarak bilirim.

FDK-2018-967 no'lu projesi ile tezin uygulama aşamasında vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Doktora veya yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Model Peynirde Peynir Bulamacı İlavesinin Proteoliz ve Bioaktif Peptit Oluşumuna Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Osman Seracettin BORAN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Üretimde kullanılan süt	23
3.1.2. Peynir mayası	23
3.1.3. Tuz.....	23
3.1.4. Peynir bulamacı.....	23
3.1.5. Ambalaj materyali	24
3.2. Model peynir üretim yöntemi	24
3.2.1. Deneme model peynir üretimi.....	24
3.2.2. Model peynir üretimi.....	27
3.3. Analiz yöntemleri	28
3.3.1. Titrasyon asitliği.....	28
3.3.2. pH değeri	28
3.3.3. Kuru madde	28
3.3.4. Yağ ve kuru maddede yağ.....	29
3.3.5. Tuz ve kuru maddede tuz	29
3.3.6. Protein ve kuru maddede protein	29
3.3.7. Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının ayrılması.....	29
3.3.7.1. Suda çözünen azot miktarı.....	29
3.3.7.2. %12 Triklorasetik asitte (TCA) çözünen azot miktarı.....	30
3.3.7.3. Kazein azot oranı	31
3.3.8. Peptit profillerinin belirlenmesi	31

3.3.8.1. %70 Etanolde çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlar	31
3.3.8.2. Ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi ile peptit profillerinin belirlenmesi	31
3.3.9. Toplam serbest amino asit miktarı	32
3.3.10. Serbest amino asitlerin belirlenmesi	33
3.3.11. Üre-Poliakrilamid jel elektroforez (Üre-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi	34
3.3.12. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi	37
3.3.12.1. 2,2 -Azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS ^{*+})).....	37
3.3.12.2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH [*]).....	38
3.3.13. ACE-İnhibitör aktivitesinin belirlenmesi	38
3.3.14. Enzim aktivitesi.....	39
3.3.14.1. Enzim aktivitesi için peynir ekstraktının hazırlanması.....	39
3.3.14.2. Peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktivelerinin ölçümü.....	39
3.3.15. Renk analizi.....	40
3.3.16. Mikrobiyolojik analizler.....	40
3.3.17. GC-MS ile uçucu bileşiklerin belirlenmesi.....	40
3.3.18. Duyusal analizler.....	41
3.3.19. İstatistiksel analizler.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Deneme model peynirleri analiz sonuçları	44
4.2. Analiz sonuçları deney dizaynı değerlendirme.....	48
4.3. Ana üretim analiz sonuçları	52
4.3.1. Bileşim ve kimyasal analiz sonuçları	52
4.3.1.1. Kuru madde	53
4.3.1.2. Yağ ve kuru maddede yağ	55
4.3.1.3. Tuz ve kuru maddede tuz değerleri	56
4.3.1.4. Titrasyon asitliği ve pH değerleri	57
4.3.2. Peynir örneklerinde meydana gelen proteoliz.....	60
4.3.2.1. Azot fraksiyonları	60
4.3.2.2. Toplam serbest amino asit miktarı.....	65
4.3.2.3. Amino asit kompozisyonu	67
4.3.2.4. Ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile belirlenen peptit profili	76

4.3.2.5. Üre-Poliakrilamid jel elektroforez (Üre-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi	84
4.3.3. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi	85
4.3.3.1. ABTS ^{*+}	86
4.3.3.2. DPPH [*]	88
4.3.4. ACE-İnhibitör aktivitesinin belirlenmesi	90
4.3.5. Peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktive ölçümü.....	93
4.3.6. Renk analizi.....	96
4.3.7. Maya ve küf sayımı	100
4.3.8. GC-MS ile uçucu bileşiklerin belirlenmesi	101
4.3.8.1. Alkoller.....	104
4.3.8.2. Aldehitler	108
4.3.8.3. Ketonlar	110
4.3.8.4. Esterler.....	112
4.3.8.5. Asitler	116
4.3.8.6. Terpenler.....	118
4.3.8.7. Çeşitli bileşikler.....	120
4.3.9. Duyusal analizler.....	124
4.3.9.1. Renk.....	126
4.3.9.2. Kesit-Yüzey	127
4.3.9.3. Yapı-Tekstür	128
4.3.9.4. Koku ve Tat	129
4.3.9.5. Olgunluk durumu.....	132
4.3.9.6. Tuzluluk.....	133
4.3.9.7. Genel kabuledilebilirlik	133
4.4. Genel Değerlendirme	135
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	142
6. KAYNAKLAR.....	143
ÖZGEÇMİŞ	165

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çeşitli peynir tiplerinde ve fermente süt ürünlerinde tanımlanmış biyoaktif peptitler	13
Çizelge 2.2 Konya ve civarı küflü peynir örneklerinden izole edilen küfler	20
Çizelge 2.3 Küflü peynir örneklerinden izole edilen küfler	21
Çizelge 3.1 Deneme model peynirleri % bileşimleri.....	25
Çizelge 3.2 RP-HPLC analizinde (A) ve (B) çözeltilerinin kromatografi süresi içerisinde kolondan geçiş oranları.....	32
Çizelge 4.1 Deneme model peynirleri 30. gündeki pH ve kimyasal analiz sonuçları	45
Çizelge 4.2 Deneme model peynirleri varyans analiz sonuçları	48
Çizelge 4.3 Cevap yüzey metodu WSN deney dizaynı	49
Çizelge 4.4 Cevap yüzey metodu deney dizaynı ile deneme model peynir örneklerinin % WSN/TN deneysel sonuçların karşılaştırılması.....	50
Çizelge 4.5 Peynir örneklerinin kimyasal bileşim sonuçları	52
Çizelge 4.6 Peynir örneklerinin kuru madde oranları varyans analiz sonuçları	54
Çizelge 4.7 Peynir örneklerinin kuru maddede yağ oranları varyans analiz sonuçları	56
Çizelge 4.8 Peynir örneklerinin kuru maddede tuz oranları varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.9 Peynir örneklerinin titrasyon asitliği ve pH değerleri varyans analiz sonuçları....	58
Çizelge 4.10 Peynir örneklerinin % WSN/TN varyans analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.11 Peynir örneklerinin % TCA/TN varyans analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.12 Peynir örneklerinin toplam serbest amino asit değerleri mg Leu/kg.....	65
Çizelge 4.13 Peynir örneklerinin TFFA varyans analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.14 Peynir örneklerinin serbest amino asit değerleri (mg/100 g) ve % oranları...	67
Çizelge 4.15 Peynir örneklerinin antioksidan kapasiteleri varyans analiz sonuçları	86
Çizelge 4.16 Model peynir örnekleri ABTS ^{•+} değerleri (Trolox mg/L)	87
Çizelge 4.17 Model peynir örnekleri DPPH [•] değerleri (Trolox mg/L).....	88
Çizelge 4.18 Model peynir örneklerine ait ACE-İnhibitör aktivite % değerleri	90
Çizelge 4.19 Peynir örneklerinin ACE-İnhibitör aktivitesi varyans analiz sonuçları	92
Çizelge 4.20 Model peynir örneklerine ait aminopehidaz aktivite değerleri (OD/g saat)...	93
Çizelge 4.21 Peynir örneklerinin enzim aktive ölçüm varyans analiz sonuçları.....	94
Çizelge 4.22 Model peynir örneklerine ait renk analizi değerleri	97

Çizelge 4.23 Peynir örneklerinin renk parametreleri varyans analiz sonuçları.....	97
Çizelge 4.24 Model peynir örneklerine ait maya ve küf sayım değerleri.....	100
Çizelge 4.25 Model peynir örneklerinde saptanan alkoller $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	106
Çizelge 4.26 Model peynir örneklerinde saptanan aldehitler $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir.....	109
Çizelge 4.27 Model peynir örneklerinde saptanan ketonlar $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	111
Çizelge 4.28 Model peynir örneklerinde saptanan esterler $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	114
Çizelge 4.29 Model peynir örneklerinde saptanan asitler $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	117
Çizelge 4.30 Model peynir örneklerinde saptanan terpenler $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	119
Çizelge 4.31 Model peynir örneklerinde saptanan çeşitli bileşikler $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peynir	121
Çizelge 4.32 Model peynir örneklerine ait duyuşsal analiz değerleri.....	125



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1 Süt proteinlerinin proteolizi sonucu meydana gelen biyoaktif peptitler	12
Şekil 2-2 Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları	16
Şekil 3-1 Bulamaç Hazırlanması	24
Şekil 3-2 Peynir üretiminde kullanılacak özel süzme ve baskı aparatı	25
Şekil 3-3 Model peynir üretimi	26
Şekil 3-4 Üretim sonrası vakum ambalajlama ve etiketleme fotoğrafı	27
Şekil 3-5 Etiket örneği	28
Şekil 3-6 Farklı konsantrasyonlarda Leu standardına karşı elde edilen absorbands değerleri	33
Şekil 3-7 Farklı konsantrasyonlarda Trolox standardının absorbands değerleri (734nm) kalibrasyon eğrisi	37
Şekil 3-8 Farklı konsantrasyonlarda Trolox standardının absorbands değerleri (517nm) kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 3-9 Duyusal analiz uygulama	41
Şekil 3-10 Duyusal değerlendirme formu	42
Şekil 4-1 Deneme model peynirleri pH 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)	47
Şekil 4-2 Deneme model peynirleri %LA 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)	47
Şekil 4-3 Deneme model peynirleri WSN 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)	48
Şekil 4-4 Peynir örneklerinin kuru madde oranları (%)	54
Şekil 4-5 Olgunlaşma süresince belirlenen kuru maddede yağ oranları (%)	55
Şekil 4-6 Olgunlaşma süresince saptanan kuru maddede tuz oranları (%)	56
Şekil 4-7 Olgunlaşma süresince saptanan titrasyon asitlik değerleri (% laktik asit)	57
Şekil 4-8 Olgunlaşma süresince saptanan pH değerleri	59
Şekil 4-9 Olgunlaşma süresince saptanan %WSN/TN değerleri	62
Şekil 4-10 Olgunlaşma süresince saptanan %TCA/TN değerleri	64
Şekil 4-11 Olgunlaşma süresince saptanan TFAA değerleri	66
Şekil 4-12 Olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu (mg/100 g) ..	73
Şekil 4-13 Olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu	74
Şekil 4-14 Olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu	75
Şekil 4-15 Peynirlerde olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri	77

Şekil 4-16 Peynirlerde olgunlaşmanın 15. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri.....	78
Şekil 4-17 Peynirlerde olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri.....	79
Şekil 4-18 Peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri.....	80
Şekil 4-19 Peynirlerde olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen % 70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri.....	81
Şekil 4-20 Peynirlerde olgunlaşmanın 15. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri.....	82
Şekil 4-21 Peynirlerde olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri.....	82
Şekil 4-22 Peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri.....	83
Şekil 4-23 Peynir örneklerinin urea-PAGE jel elektroforetogramları.....	84
Şekil 4-24 Olgunlaşma süresince saptanan ABTS ⁺⁺ (Trolox mg/L) değişimi	87
Şekil 4-25 Olgunlaşma süresince saptanan DPPH* (Trolox mg/L) değişimi	89
Şekil 4-26 Olgunlaşma süresince saptanan ACE-İnhibitör aktivite değerleri.....	92
Şekil 4-27 Olgunlaşma süresince saptanan aminopeptidaz aktivite değerleri.....	94
Şekil 4-28 Olgunlaşma süresince saptanan <i>L</i> * aydınlık değerleri.....	98
Şekil 4-29 Olgunlaşma süresince saptanan <i>a</i> * (<i>yeşil ton</i>) değerleri	99
Şekil 4-30 Olgunlaşma süresince saptanan <i>b</i> * (<i>sarı ton</i>) değerleri	100
Şekil 4-31 Olgunlaşma süresince saptanan maya-küf sayım (kob/g) değerleri.....	101
Şekil 4-32 Peynirlerdeki serbest amino asitlerin katabolizması genel izlenimi	103
Şekil 4-33 Peynirlerdeki serbest yağ asitlerin katabolizması genel izlenimi	104
Şekil 4-34 Olgunlaşma boyunca model peynir örneklerinde saptanan uçucu bileşik miktarları	122
Şekil 4-35 Olgunlaşma boyunca model peynir örneklerinde saptanan uçucu bileşik miktarları % dağılımı.....	123
Şekil 4-36 Olgunlaşma süresince peynirlerin renk duyusal değerleri	127
Şekil 4-37 Olgunlaşma süresince peynirlerin kesit-yüzey duyusal değerleri.....	128
Şekil 4-38 Olgunlaşma süresince peynirlerin yapı-tekstür duyusal değerleri	129
Şekil 4-39 Olgunlaşma süresince peynirlerin koku duyusal değerleri	130
Şekil 4-40 Olgunlaşma süresince peynirlerin tat ve lezzet duyusal değerleri	130

Şekil 4-41 Olgunlaşma süresince peynirlerin yabancı tat duyusal değerleri.....	131
Şekil 4-42 Olgunlaşma süresince peynirlerin süt tadı duyusal değerleri.....	132
Şekil 4-43 Olgunlaşma süresince peynirlerin olgunluk duyusal değerleri	132
Şekil 4-44 Olgunlaşma süresince peynirlerin tuzluluk duyusal değerleri	133
Şekil 4-45 Olgunlaşma süresince peynirlerin genel kabuledilebilirlik değerleri	134



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ACE-I	: Angiotensin converting enzyme-İnhibisyon
Ala	: Alanine
Arg	: Arginine
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartic acid
Cd-Ninhidrin	: Cadmium Ninhydrin
Cys	: Sistein
dk	: Dakika
FAA	: Free amino acid
g	: Gram
g	: Gravity, bağıl santrifüj kuvveti
Gln	: Glutamin
Glu	: Glutamic acid
Gly	: Glisin
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
kg	: Kilogram
kob/g	: Koloni oluşturan birim/ gram
Leu	: Lösin
Lys	: Lisin
L	: Litre
M	: Molar
Met	: Metiyonin
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
PCA	: Principal Component Analysis, Temel Bileşen Analizi
Phe	: Fenilalanin
Pro	: Prolin

PTA	: Fosfotungstik asit
RP-HPLC	: Reversed-Phase high performance liquid chromatography
RSM	: Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology)
s	: Saniye
Ser	: Serin
Thr	: Treonin
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirosin
Üre- PAGE	: Üre-Polyacrylamide gel electrophoresis
Val	: Valin
α	: Alfa
β	: Beta
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

ÖZET

Doktora Tezi

MODEL PEYNİRDE PEYNİR BULAMACI İLAVESİNİN PROTEOLİZ VE BİOAKTİF PEPTİT OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Osman Seracettin BORAN

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

165+XIV sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU

Bu çalışmada, model peynir üretiminde Küflü peynir bulamacı kullanılarak olgunlaşmanın hızlandırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın hipotezi, Küflü peynirin içerdiği *Penicillium roqueforti* kaynaklı hücre dışı proteinazların model peynirde olgunlaşmayı hızlandırabileceği üzerine kurgulanmıştır. Çalışmanın birinci aşamasında, olgunlaşma hızını etkileyeceği düşünülen bulamaç oranı (% 0, 1, 3 ve 5), tuz oranı (% 1, 2 ve 3) ve olgunlaşma sıcaklığı (5 °C, 10 °C ve 15 °C) faktörlerine bağlı olarak deneme model peyniri üretimi yapılmıştır. Cevap Yüzey Metodu (RSM) kullanılarak üretilen peynirler 30 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, RSM sonuçlarına göre optimize edilen koşullarda üretilen peynirler, 60 gün süre ile olgunlaştırılmış ve olgunlaştırmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde analizleri yapılmıştır. Peynirlerin titrasyon asitliği ve pH değerlerinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Kontrol örneğinin 60 günde ulaşılan suda çözünen ve %12 TCA'da çözünen azot değerlerine, %5 bulamaç ilavesi ile yaklaşık 30 günde ulaşılmıştır. Bulamaç kullanımının serbest amino asit kompozisyonu üzerine önemli düzeyde etkisi olmuş ($P<0.01$), bulamaç kullanımı ile özellikle Ile, Leu, Phe ve Val miktarlarında artışa neden olmuştur. Bulamaç ilavesinin peynirlerin tüm olgunlaşma dönemlerinde RP-HPLC peptit profilleri ve üre-PAGE elektroforetogramlarında önemli düzeyde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Buna göre, peynirlerin proteoliz seviyesine bulamaç ilave edilen peynirlerin biyokimyasal aktivitesinin önemli derecede etkilendiği anlaşılmıştır. Antioksidan aktivite olarak; ABTS^{•+} değerlerinde örnekler arasındaki farklılık bulunurken ($P<0.05$), DPPH değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Bulamaç ilavesinin peynirler arasında uçucu bileşikler açısından etkisi önemli olmuştur. Olgunlaşmanın 60. gününde çeşitli bileşikler ve aldehitler hariç, diğer saptanan uçucu bileşiklerin sayısı ve miktarları kontrol örneğine göre daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Bulamaç kullanımı ile olgunlaşmanın 15. gününde en yüksek aminopeptidaz aktivitesine ulaşılmıştır. Sadece düşük depolama sıcaklığına sahip örneğin aminopeptidaz enzim aktivite değeri depolama boyunca artmıştır. Bulamaç ilaveli peynirlerde ACE-inhibitör aktivitesi daha yüksek bulunmuş ve depolama boyunca artış görülmüştür. Bulamaç ilavesi oranına bağlı olarak depolama boyunca L*(aydınlık) değerlerinde azalma meydana gelirken, a* ve b* değerlerinde artma meydana gelmiştir. Bulamaç ilave edilmesi ile model peynirlerin duyu özelliklerinde azalma meydana gelmiş, ancak genel kabul edilebilir olarak değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, %5 bulamaç, %1 tuzun kullanıldığı ve olgunlaştırma sıcaklığı 15 °C olan model peynirin duyu özellikler hariç diğer analiz parametrelerinde kalite açısından en uygun sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Model Peynir, Konya Küflü Peyniri, Bulamaç, RSM, Proteoliz, Enzimatik Aktivite

ABSTRACT

PhD. Thesis

DETERMINING THE EFFECT OF ADDITION OF CHEESE SLURRY ON PROTEOLYSIS AND FORMING OF BIOACTIVE PEPTIDES IN THE MODEL CHEESE

Osman Seracettin BORAN

Inonu University

Graduate School of Nature and Applied Sciences

Department of Food Engineering

165+XIV sayfa

2021

Supervisor: Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU

In this study, in the production of model cheese It is aimed to accelerate the ripening by using moldy cheese slurry. The hypothesis of the study is that the extracellular proteinases originating from *Penicillium roqueforti* contained in moldy cheese can accelerate the ripening of the model cheese. In the first stage of the study, the slurry ratio (0, 1, 3 and 5%) salt ratio (1, 2 and 3%) and depending on the ripening temperature (5 °C, 10 °C and 15 °C) factors trial model cheese was produced. Cheeses produced using the Response Surface Method (RSM) were ripened for 30 days. Cheeses produced under optimized conditions according to RSM results were ripened for 60 days and analyzed on the 1st, 15th, 30th and 60th days of ripening. Significant differences were found in the titratable acidity and pH values of the cheeses. The nitrogen values of the control sample, which were dissolved in water and 12% TCA in 60 days, were reached in about 30 days with the addition of 5% slurry. The use of slurry had a significant effect on free amino acid composition ($P<0.01$), there was caused an increase in the amount of Ile, Leu, Phe and Val, especially with the use of the slurry. It was observed that the addition of slurry had a significant effect on RP-HPLC peptide profiles and urea-PAGE electrophoretograms during all ripening periods of cheeses. Accordingly, cheeses with slurry added to the level of proteolysis It has been found that its biochemical activity is significantly affected. As antioxidant activity; ABTS^{•+} While finding differences between samples in values ($P<0.05$), The difference between DPPH[•] values was not significant ($P>0.05$). The effect of slurry addition in terms of volatile compounds among cheeses was significant. On the 60th day of ripening, the number and amounts of other volatile compounds were found to be higher than the control sample except for various compounds and aldehydes. The highest aminopeptidase activity was reached on the 15th day of ripening with the use of slurry. Only the aminopeptidase enzyme activity value of the sample with low storage temperature increased during storage. ACE-inhibitory activity was found to be higher in slurry added cheeses and increased during storage. Depending on the slurry addition rate, while there was a decrease in the lightness values during the storage, there was an increase in the a* and b* values. With the addition of slurry, the sensory properties of model cheeses decreased, but they were considered to be generally acceptable. As a result, it was determined that the model cheese using 5% slurry and 1% salt and having a ripening temperature of 15 °C gave the most suitable results in terms of quality in other analysis parameters except for the sensory properties.

Keywords: Model cheese, Moldy cheese of Konya, Slurry, RSM, Proteolysis, Enzymatic activity

1. GİRİŞ

Peynirin olgunlaşması, birçok mikrobiyolojik, biyokimyasal ve metabolik reaksiyonların bir bütünü olarak tanımlanmaktadır (Singh vd., 2003; Farkye, 2004). Bu reaksiyonlar, peynirde lezzet ve yapıdaki değişimlerle ilişkilidir (Smit vd., 2005). Bu değişimlere etki eden özellikler nem, pH, tuz, starter ve starter olmayan mikroflora ve ilave edilen starterlerin etkileri ile önemli düzeyde değişebilmektedir (Singh vd., 2003). Birincil değişimler; proteoliz, glikoliz ve lipolizdir. İkincil katabolik değişimler ise amino asitlerin deaminasyonu, dekarboksilasyonu ve desülfürizasyonu, yağ asitlerinin oksidasyonu ve esterifikasyon gibi bazı sentetik değişimlerdir (McSweeney, 2004). Birincil reaksiyonlar genellikle peynirin yapısal değişimi ve aroma oluşum mekanizmaları üzerinde etkili olurken, ikincil reaksiyonlar ise peynirin duyu özelliklerini belirler ve yapısını modifiye eder (Singh vd., 2003).

Proteoliz; peynirin olgunlaşması süresince meydana gelen en kompleks ve en önemli biyokimyasal prosestir (McSweeney ve Sousa, 2000; Sousa vd., 2001; Upadhyay vd., 2004). Olgunlaşma boyunca gerçekleşen tüm proteoliz reaksiyonlarının sonucunda uzun ve orta zincirli peptitler, kısa peptitler ve serbest amino asitler oluşur. İleri proteoliz reaksiyonu ile oluşan kısa peptitler ve serbest amino asitler peynir lezzetinin oluşmasında etkilidir (McSweeney, 2004; Vítová vd., 2006).

Proteoliz; rennet, plazmin ve mikrobiyal proteazlar (starter ve starter olmayan bakterilere ait) vasıtasıyla gerçekleşir. Bu proteolitik enzimler, peynirin lezzetine doğrudan etkili olan küçük peptitlerin ve amino asitlerin oluşmasını sağlar (Law, 2001). Birincil proteoliz kimozen ve plazminin aktivitesi sonucu gerçekleşir (Forde ve Fitz-Gerald, 2000). Kazeinin hidrolize olması sonucu büyük ve orta zincirli peptitler meydana gelir. Bu peptitler de mikrobiyal enzimler (starter ve starter olmayan bakterilere ait) ve koagülantlar vasıtasıyla gerçekleşen ikincil proteoliz ile küçük peptitlere dönüştürülür. Ancak bakteri hücresinin parçalanmasından sonra ortaya çıkan hücre içi enzimler kısa peptitleri serbest amino asitlere parçalarlar (Sousa vd., 2001). Orta ve küçük büyüklükteki peptitlerin çoğu peynir çeşidine bağlı olarak et suyuna benzer lezzet bileşenlerinin açığa çıkmasına ve kısa zincirli hidrofobik peptitler ise acı lezzetin oluşumuna neden olmaktadır. Bazı amino asitler lezzet

bileşenlerinin oluşumundan sorumlu olup, Ala, Gly, Pro, Ser ve Thr tatlı, Asp, Glu ve His ekşi ve Arg, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr ve Val,) acı tad vermektedirler (McSweeney, 2004; Vítová vd., 2006).

Yapısal proteinler içinde inaktif formda bulunan ancak proteoliz sonucunda meydana gelen önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip amino asit zincirleri, spesifik özellikleriyle “fonksiyonel peptitler” olarak adlandırılırlar. Bu bileşiklere genellikle “biyoaktif peptitler” de denilmektedir (Froetschel, 1996; Tirelli vd., 1997). Biyoaktif peptitler genellikle 2-20 amino aside sahip kısa zincirli bir yapıda peptitlerdir. Süt ve süt ürünlerinin içerdiği peptitler olmak üzere çoğu peptit iki ya da daha fazla biyolojik aktivitelerde rol alarak çok fonksiyonlu özellik gösterirler (Pihlanto, 2001).

Biyoaktif peptitler, proteinlerin enzimatik proteolizi sırasında ve ayrıca gıda işleme (pişirme, fermentasyon, olgunlaşma) sırasında açığa çıkabilmektedir (Bhopale, 2016; Daliri vd., 2017). Biyoaktif peptitler protein molekülleri içerisinde inaktif formdadır ve üç farklı yolla oluşmaktadır. Bunlar; enzimatik hidroliz, sindirim enzimleri olan pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimleri ile parçalanması ve proteolitik enzimler ya da mikrobiyal veya bitki kaynaklı enzimler ile gerçekleşen süt fermentasyonu şeklindedir (Korhonen, 2009). Biyoaktif peptitler ayrıca gastrointestinal sistemde ileri derecede gerçekleşen proteolitik parçalanmalar sonucunda meydana gelebilir. Gastrointestinal sistemde meydana gelen peptitler, bölgesel olarak ya da kan dolaşımı ile hedef organa ulaşarak etki edebilir (Korhonen ve Pihlanto, 2004). Biyoaktif peptitler besinsel değerinin yanında vücut fonksiyonlarında fizyolojik etkiye sahip "gıda kaynaklı bileşenler" olarak tanımlanmaktadır (Vermeirssen vd., 2004). Peptitde bulunan amino asit sekansı peptitin fonksiyonel özelliğini belirler. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda süt türevli biyoaktif peptitlerin antihipertansif, bağışıklık sistemini düzenleyici, antimikrobiyal, mineral bağlayıcı ve antioksidan özellikler gibi çeşitli fizyolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2003; 2006).

Biyoaktif peptitler; peynir, kefir, süt ve yoğurt olmak üzere çoğu süt ürünlerinden izole edilebilmektedirler. Yüksek oranda protein içeren peynirlerde olgunlaşma boyunca gerçekleşen proteolizin yoğunluğu ve proteolitik sisteminin aktivitesine bağlı olarak peynirlerin biyoaktif peptitlerin doğal bir kaynağı olarak düşünülebilir (Park vd., 2007). Olgunlaşma sırasında gerçekleşen ikincil proteoliz diğer biyoaktif peptitlerin oluşmasına ve peynirin olgunlaşma derecesine bağlı olarak biyoaktivitelerine öncülük edebilirler (Haque vd., 2008). Sütte mevcut enzimler, rennetteki enzimler ya da mikroorganizmalara ait

enzimler kazeini hidrolizi ederek α_{s1} -, α_{s2} -, β - ve κ -kazeinleri meydana getirirler ve peynirler biyoaktif peptitler açısından zengindirler (Pihlanto, 2006).

Biyoaktif peptitlerde antioksidan aktivite; peptitlerin radikal süpürme, lipid peroksidasyonu inhibisyonu ve metal iyon şelasyon özelliklerine bağlıdır. Ayrıca peptit yapısının ve amino asit dizisinin antioksidan özelliklerini etkileyebileceği öne sürülmüştür (Sarmadi ve Ismail, 2010). Peptitlerin antioksidan aktivitesi belirli amino asit sekanslarının mevcudiyeti ile ilişkilidir (Suetsuna vd., 2000; Chen vd., 1996). Keçi sütü peynirinden elde edilen Pro-His-His sekansına sahip peptitlerin en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir (Silva vd., 2006). Sindirim enzimleri ile kazeinin hidrolize edilmesi ve proteolitik laktik asit bakteri suşları tarafından gerçekleşen süt fermentasyonu esnasında antioksidan özelliğe sahip peptitlerin oluştuğu saptanmıştır (Korhonen ve Pihlanto, 2006).

In vitro veya *in vivo* hidroliz ile oluşan peptitlerin spesifik ve spesifik olmayan bağlanma bölgeleri sayesinde mineral tutucu olarak etki ederler. Peptitler, çeşitli minerallerin taşıyıcıları ve şelatörleri olarak fonksiyon göstermektedirler. Bu nedenle biyoyararlanımı destekler ya da inhibe ederler. Temel kalsiyum bağlayıcı peptitler, kazeinler, α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein ve κ -kazeindir. Ayrıca peynir altı suyu proteinleri ve laktoferrin Ca, Mg, Zn, Fe, Na ve K gibi spesifik mineralleri bağlar (Vegarud vd., 2000).

α -Heliks yapısına sahip çoğu peptit, katyonik ve amfipatiktir (hem hidrofilik hem de hidrofobik). Hidrofobik α -heliks yapısına sahip peptitler antimikrobiyal özellik gösterir (Epand ve Vogel, 1999). Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal peptitler; bazı antibiyotik dirençli patojenlere karşı aktivite göstermesi dahil olmak üzere hedef hücreleri hızlıca öldürebilmesi ve geniş bir etki spektrumuna sahip olması gibi üstünlüklere sahiptir. Antimikrobiyal peptitlerin öldürme oranı bakteriyel çoğalma oranından daha yüksektir (Bechinger, 1997). Çeşitli İtalyan peynirlerinde tanımlanmış olan antibakteriyel peptitlerin antimikrobiyal aktivitesi, İtalyan peynirlerinde kullanılan suş tiplerine ve biyoteknolojik uygulamalara göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Rizello vd., 2005)

Son yıllarda biyoaktif peptitlerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri hakkında pek çok çalışma yapıldığı ve bu çalışmaların da özellikle fermente süt ürünleri üzerinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Biyoaktif peptitler hipertansiyon, diyabet, obezite ve hatta kanser gibi metabolik bozuklukların etkin bir şekilde yönetimi için ilaçlara karşı doğal terapötik alternatif olarak önerilmiştir. Protein hidrolizi, istenen fonksiyonel veya biyoaktif özelliklere sahip peptitler açığa çıkaracak şekilde düzenlenebilmekte, ancak aşırı ve kontrolsüz hidroliz sonucu arzu

edilmeyen lezzet ve acı tada sahip peptitler oluşabilmektedir (Aluko, 2017; Aryee vd., 2018; Meng vd., 2018). Süt ürünlerinin, enzimlerin etkisiyle proteinlerde meydana gelen parçalanma, gastrointestinal bölgede sindirimi ve starter kültürler tarafından parçalanması sonucu ACE inhibitör, antioksidatif, opioid, antiinflamatuvar, antikanserojen, antikariyojenik gibi pek çok biyoaktif özellik gösteren peptit elde edilmiştir. Bazı ülkeler bu biyoaktif peptitlerce zengin fonksiyonel ürünler üretmiş ve üretilen ürünler market raflarında yerini almıştır.

Peynirde birincil değişimlerden olan glikoliz reaksiyonunun, laktozdan laktat oluşumu için bütün peynir çeşitlerinde gerçekleşmektedir (McSweeney ve Fox, 2004). Laktozun parçalanması düşük molekül ağırlıklı lezzet bileşiklerinden diasetil, aseton, asetat, asetaldehit, etanol, asetik asit ve propiyonik asitinde içinde yer aldığı fazla miktarda lezzet bileşiğinin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Forde ve Fitz-Gerald, 2000). Bu değişim sırasında üretilen L-laktat ana izomerdir ve peynir lezzetine katkıda bulunmaktadır (Fox ve Law, 1991). Olgunlaşma boyunca trigliseridlerden serbest yağ asitleri meydana gelmektedir ve bu reaksiyon “lipoliz” olarak adlandırılır. Toplam serbest yağ asidi ve kısa/uzun zincirli yağ asidi oranı peynir olgunlaşması boyunca lipaz enziminin tipi ve miktarı ile ilişkilendirilmiştir (Hernandez vd., 2009). Gıdaların bileşiminde yer alan lipid ve türevleri hidrolitik ve/veya oksidatif parçalanma işlemine uğrayabilmektedirler. Fakat peynirlerdeki bu oksidatif parçalanmalar düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyelinden dolayı sınırlı miktardadır (McSweeney ve Sousa, 2000; Collins vd., 2003a). Peynirlerde lipoliz genellikle lipaz enzimin aktivitesi sonucu hidrolitik parçalanma ile gerçekleşir.

Peynirde mevcut lipaz enzim varlığı; sütte (lipoprotein lipaz), koagülant ve peynir mikrobiyotasında mevcut olan starter, starter olmayan veya yardımcı mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır (McSweeney ve Sousa, 2000; Perotti vd., 2005). Starter kültürlerde yer alan laktik asit bakterileri çoğunlukla zayıf lipolitik etki göstermektedirler. Çoğu yağ asitleri küflerin trigliseridleri parçalamasıyla ortaya çıkmaktadır. (Vítová vd., 2006). Çoğu peynir çeşidinde yağ asitleri tadın oluşumundan doğrudan sorumludurlar. Örneğin yoğun tada sahip bütirik asit (C₄) ve kaproik asit (C₁₀) Hindistan cevizi, keçimsi, keskin, ransid ve sabunumsu benzeri tatları oluşturmaktadır (Singh vd., 2003; McSweeney, 2004). Olgunlaşma periyodu boyunca yağ asitlerinin diğer bir işlevi ise uçucu bileşikler; alkanlar, esterler, laktonlar, metil ketonlar ve diğerlerinin açığa çıkmasında öncül olmalarıdır (Collins vd., 2003b; Alewijn vd., 2005).

1960'lı yıllardan beri peynirlerdeki hızlı olgunlaşmalar üzerine başlatılan araştırma çalışmalarında birçok enzim sistemlerinin farklı metodlarda peynir üretimine dahil edilmesi, modifiye laktik asit bakterileri kullanımı, olgunlaştırma için depolama şartlarının değiştirilmesi, peynire bulamaç ilavesi vb. yöntemler uygulanmıştır. Bu çalışmaların çoğunda olgunlaşmada istenilen ilerlemeler kaydedilmiştir. Günümüzde ürün güvenliğini etkileyen tehlikelerin önceden belirlenmesi ve kontrol altına alınmasını sağlayan HACCP üretim modelinin peynir işletmelerinde kullanılmaya başlanması ile birçok hızlı olgunlaşma yöntemini rahatlıkla ve güvenilir uygulanmaktadır. Olgunlaştırma sıcaklığının artırılması, HP (yüksek basınç uygulaması), peynire bulamaç ilavesi, çeşitli substrat ve enzim karışımları ile zayıflatılmış veya genetiği modifiye edilmiş starterler kullanılmaktadır. Özellikle nihai üründe zengin tat ve aroma oluşturmak için starter olmayan maya, küf ve bakterilerin kullanılması konularında da araştırmalar bulunmaktadır (Tunçtürk, 2003). Peynir üretiminde mikrobiyal kaynaklı enzim varlığının artırılması işlemi ile lezzet oluşumu, olgunlaşmanın hızlandırılması veya modifiye edebilmek amacıyla uygulanabilecek en etkili uygulamalardan birisi olduğu bildirilmiştir (Upadhyay vd., 2007). Peynirin olgunlaşma sürelerinin belirlenmesi ve olgunlaşma sürelerinin kısaltılmasına yönelik üretim parametrelerinin geliştirilmesi aynı zamanda peynir dokusunu, lezzetini ve aroma gelişimi amaçlanmaktadır (Hickey vd., 2015). Peynir aroması genellikle peynir pıhtısının hücre dışı enzimlerle proteolizi ve lipolizi yoluyla elde edilir. Enzimle modifiye edilmiş peynir (EMC) üretiminde enzimatik modifikasyonların uygulanma prosedürü ve sırasına bağlı olarak üç ana teknik vardır (esas olarak proteoliz ve lipoliz). Bu teknikler içerisinde yaygın ve genellikle ticari olarak kullanılan; kontrollü koşullar altında peynir pıhtısının aynı anda proteolizine ve lipolizine dayanan tek aşamalı bir işlemdir. Bununla birlikte, enzimlerin bireysel etkilerinin belirlenmesindeki zorluklar, proteoliz ve lipoliz yönetimini daha zor hale getirdiğinden uygulanacak işlemler titizlikle tasarlanmalıdır (Wilkinson vd., 2011). Peynirde hedeflenen aromaya bağlı olarak izlenmesi ve yönetilmesi kolay daha fazla peynir çeşidi üretimi için lipolize ve proteolize edilmiş bulamaçların farklı oranlarda harmanlanarak kullanılması ile sağlanabileceğini bildirilmiştir (Bas vd., 2019).

Olgunlaşmayı hızlandırma ve peynir tadını geliştirme çalışmaları için çeşitli peynir bulamacı model sistemleri kurulmuştur (Castada vd., 2015). Starter kültürlerin veya enzimlerin peynirdeki etkisini hızlı bir şekilde değerlendirmek için peynir bulamaç sistemleri önerilmektedir. Bulamaç ile kısa süreler içinde (20 gün kadar) ve yüksek sıcaklıkta (30

°C'de) depolama ile peynir olgunlaşmasında önemli biyokimyasal değişimleri sağlamaktadırlar (Milesi vd., 2011). Peynir bulamacının pıhtıya ilavesi uzun yıllardır bilinen bir uygulama olup, peynir teknolojisinde olgunlaşmayı hızlandırmada geniş kullanım alanı bulmuştur. Ağırlıklı olarak eritme peynirleri, atıştırmalıklar (snacks), taklit (imitation) süt ürünleri ve enzim modifiye peynirlerin üretiminde kullanılmanın yanı sıra olgunlaşmayı hızlandırmak için kullanılacak olan enzimlerin gelişim ortamlarının belirlenmesi amacıyla da bu yönetime başvurulmaktadır. Ayrıca doğal peynir aromaları üretmek için geliştirilen alternatif teknikler arasında da yer almaktadır (Salum vd., 2019 ; Soccol vd., 2007). Örneğin olgunlaşmış peynirlerin bir peynir bulamacına dönüştürülmesine ve bulamacın peynir tozu elde etmek için püskürtülerek kurutulmasına dayanmaktadır (da Silva vd., 2018).

Bu anlamda gerçekleştirilen bu çalışmada; hücre dışı enzim aktivitesi yüksek olan Konya Küflü peynirinden elde edilmiş bulamaç, farklı oranlarda model peynir üretiminde kullanılmış ve peynirdeki proteoliz ve biyoaktif peptit oluşumuna katkısı ile diğer kimyasal ve duyuşsal parametrelere etkisi incelenmiştir.

Küfle olgunlaşan peynirlerde, bakterilerden daha çok enzimatik reaksiyonlar proteolize katkılarından dolayı belirgin olgunlaşma değişiklikleri gözlenir. Örneğin, (1) laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit küflerce metabolize edilir ve peynirlerin pH'sı olgunlaşmanın sonuna doğru 6.0'ın üzerine çıkar; (2) peynirdeki toplam yağ asitlerinin % 5'inden fazlasını küflerin hücre dışı lipazları, uygun pH 6-8 aralığındaki lipaz aktivitesinden dolayı serbest yağ asitlerine dönüştürürler; (3) Küfle olgunlaşan peynirdeki proteoliz seviyesi, kimozen, plazmin ve starter olmayan mikroorganizmalar dahil olmak üzere bir çok enzime ek olarak fungal proteazlarından dolayı ileri seviyelerde gerçekleşmektedir (Hayaloğlu vd., 2008). Bu nedenle bulamaç hazırlanmasında peynir yüzeyindeki küflü kısım uzaklaştırılmış, küfle olgunlaşmadan kaynaklı zengin enzim varlığından dolayı iç kısmı kullanılmıştır.

Olgunlaşma periyoduna etki eden diğer değişkenler; tuz, olgunlaşma sıcaklığı, bulamaç kullanım oranları göz önüne alınarak Cevap Yüzey Metodu [Response Surface Methodology (RSM)] ile deney dizaynı oluşturulmuştur.

Mavi damarlı peynirler, peynirin içinde ve dışında gelişen *P. roqueforti* tarafından olgunlaştırılır. *P. roqueforti* tarafından üretilen enzimler, starter olmayan mikroorganizmalar ve sütte bulunan diğer enzimler nedeniyle Blue peynirde proteoliz ve lipoliz dereceleri çok yüksektir (Xia vd., 2020). *P. roqueforti*; küfü öldüğünde ve parçalandığında açığa çıkan

proteolitik enzimlerin ana kaynağıdır (Masotti vd., 2017). Aynı zamanda suda çözünen azot ve uçucu bileşiklerin öncüleri amino asitlerin oluşumuna yol açar (Lawraro, 2004). Ayrıca *Penicillium* spp. peynirde ana lipolitik mikrobiyal kaynaklardandır (Preddy vd., 2013). Bu nedenle tez çalışmasında izole edilen küflerin yarıya yakın kısmı *P. roqueforti* (Hayaloglu ve Kirbag, 2007) olan bir dominant tür küf içeren, tat ve aroma yoğunluğu yüksek olan Konya ve yöresi küflü peynirin bulamacı kullanılmıştır.

Model peynirde bulamaç kullanımının proteoliz ve bioaktif peptit oluşumuna olumlu etkisinin yanında aroma, yapı, tekstür vb. özelliklerine etkisinin araştırılması çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Tuz konsantrasyonu, olgunlaşma sıcaklığı ve bulamaç oranı parametrelerindeki değişkenlik ile 36 adet model peynir üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşmanın 30. gün olgunlaşma indeksleri ve bileşim analiz değerlerinden faydalanılarak Design Expert v.9 paket programı kullanılmış ve en iyi ACE-inhibisyonu oluşturabilecek deney koşulları (tuz konsantrasyonu, olgunlaşma sıcaklığı ve bulamaç oranları) belirlenmiştir. Üretimi gerçekleştirilen dört adet model peynir 60 süre ile olgunlaşmaya bırakılmış, olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerine ait analizleri yapılmıştır. Depolama boyunca model peynirlerin bileşim değerleri, suda ve çeşitli çözücülerde çözünebilen azot fraksiyonları, toplam serbest amino asit miktarı ile amino asit kompozisyonu, elektroferik (üre-PAGE), spektrofotometrik (antioksidan ve enzim aktivitesi), kromatografik (peptid profili, bioaktif peptit-ACE) analizleri ile fiziksel, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Peyniri olgunlaştırmak, bu amaçla yapılan depoların inşaatı, makine harcamaları, enerji ve işçilik giderlerinden dolayı pahalı bir süreçtir. Bu açıdan, özellikle sekonder flora olmaksızın olgunlaşması uzun süre gerektiren peynirlerde, hızlandırılmış olgunlaştırma işlemleri daha cazip görünmektedir. Ancak hızlı olgunlaştırmanın amacına ulaşılabilmesi için, bazı ön koşulları sağlaması gerekmektedir. Bunlar kısaca; hızlı olgunlaştırılan peynirlerin referans peynirden (geleneksel yöntemle üretilen orijinal peynir) önemli bir farklılığının olmaması, aşırı olgunlaşma sonucu peynirin tüketim sınırları dışına çıkmasının engellenebilmesi, hızlı olgunlaştırma için harcama girdilerinin olgunlaşma süresindeki azalma ile elde edilecek ekonomik kazanç miktarı ve mevzuatın belirlediği standartlara uygunluğu önem arz etmektedir (Walstra vd., 1999).

Peynirde olgunlaşma kalitesi, olgunlaşma sürecinin bir döneminde maksimum düzeye ulaşmaktadır. Peynir çeşidine göre olgunlaşmanın belirli olan bu dönemde üründe kendine has tekstürel ve duyuşsal özellikler oluşmaktadır. Bu süreç her peynir çeşidinde farklılık göstermektedir. Nem oranı yüksek peynirlerin olgunlaşma süresi genelde kısa zaman alırken, nem oranı düşük yarı sert ve sert peynirlerde ise olgunlaşma süreci daha uzun sürmektedir (Fox vd., 1996).

Olgunlaşma prosesine tabi tutularak üretilen peynirde pıhtının pH içeriği, plazmin, kimozen, starter ve starter olmayan laktik asit bakterilerinin proteazları, tuz/nem oranı, depolama zamanı, depolama sıcaklığı ve nem gibi bazı faktörlerden proteolizin etkilendiği belirtilmiştir (Park ve Jin, 1998).

Biyoaktif peptitler, yapısal proteinler içinde inaktif formda bulunurlar. Enzimatik aktivite ile açığa çıktıklarında kendilerine has özellikleri nedeniyle önem arz eden fizyolojik fonksiyonlara sahip amino asit zincirleri “fonksiyonel peptitler” olarak tanımlanmaktadır (Froetschel, 1996; Tirelli vd., 1997). Biyoaktif peptitler genellikle 2-20 amino asit kalıntısı içeren kısa zincirli bir yapıya sahip peptitlerdir, fakat bazı durumlarda 20'den fazla amino

asit içeren biyoaktif peptitler mevcuttur, bu duruma örnek olarak 64 amino asit içeren kazeinomakropeptit (KMP) örnek verilebilir (Hartmann ve Meisel, 2007).

Boyutları küçük ve hidrofobik özellikte olmaları daha kolay absorbe edilmelerini sağlamaktadır (Kınık ve Gürsoy, 2002). Biyoaktif peptitler vücut fonksiyonlarını düzenleyen ve pozitif etkiye sahip spesifik protein fragmentleri olarak da ifade edilebilmektedir. FitzGerald ve Murray (2006) biyoaktif peptitleri fizyolojik tepkilerin oluşmasını sağlayan hedef hücreler üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanarak fizyolojik fonksiyonları düzenleyen hormon ya da ilaç benzeri aktivite gösteren peptitler olarak tanımlamıştır. Biyolojik aktiviteleri, amino asit kompozisyonlarına ve dizilerine bağlıdır (Möller vd., 2008; Korhonen 2009). Amino asit dizisine bağlı olarak bu peptitler, opioid (uyuşturucu) benzeri, mineral bağlayıcı, bağışıklık sistemini düzenleyici, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, hipokolesterolemik, kanser önleyici, kalp krizlerine karşı koruyucu ve antihipertansif etkiler gibi çeşitli aktiviteler gösterebilmektedir. Süt ürünleri çeşitli biyofonksiyonel peptitlerin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2003; Meisel, 2005; Erdmann vd., 2008; McClements vd., 2009).

Besinler açısından biyoaktif peptitler terimi, insanlarda yeterli ve dengeli beslenmeyi desteklemesinin yanında metabolizma fonksiyonlarını düzenleyici etkiye sahip bitkisel veya hayvansal kaynaklı peptitleri de kapsamaktadır. Biyoaktif peptitler gıdaların doğal bir bileşeni olabilecekleri gibi protein sekansında inaktif formda bulunan peptitlerin enzimatik hidrolizle aktif forma dönüşürler (Meisel, 2005; Korhonen ve Pihlanto, 2006; FitzGerald ve Murray, 2006). Proteinlerin kimyasal yapısında bulunan biyolojik olarak aktif formdaki amino asit zincirleri, laboratuvar ortamında enzimatik olarak ve/veya canlı ortamda proteinlerin sindirim sistemi içerisinde oluşumları mümkündür (Meisel, 1998). Gıdanın işlenmesi sırasında gerçekleştirilen proseslerde, kullanılan metotlarda (kimyasal, enzimatik uygulamalar veya fermentasyon metotları) ya da gıdanın tüketiminden sonra sindirim sisteminde gerçekleşen reaksiyonlarla proteinler hidrolize uğrayarak biyoaktif peptitler oluşabilmektedir. Mesela, peynir olgunlaşması esnasında gerçekleşen başlıca biyokimyasal reaksiyon olan proteoliz ile proteinlerin parçalanması ile biyoaktif peptitler meydana gelmektedir. Bu katabolizma reaksiyonunda süten gelen plazmin enzimi, rennetten gelen pepsin ve kimozen enzimleri ve mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen enzimler önemli bir rol almaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006; FitzGerald ve Murray, 2006).

Biyoaktif bileşikler vücut içerisinde serbest kalmaları veya açığa çıkmalarından sonra hormon benzeri aktiviteleriyle düzenleyici bileşikler olarak fonksiyon sergilerler. Bu

fonsiyonel özellikleri nedeni ile “gıda hormonu” adı ile isimlendirilmektedir. Gıdalardan doğrudan alınan veya bağırsak sistemimizde açığa çıkan biyoaktif peptitler bağırsakta yer alan belirli bölgelerle etkileşim yaparlar. Devamında absorbe edilmeleri ile sekonder lenfoid organlara ulaşırlar (Meisel, 2005; Möller vd., 2008).

Gıdalarda bulunan bazı proteinler biyolojik olarak aktif peptitleri içermektedirler. Protein kaynaklı olan biyoaktif peptitler; doğal yoldan bitki veya hayvan kaynaklı besinlerden ya da genetiği değiştirilmiş kaynaklarda izole edilebilirler. Biyolojik olarak aktif olan peptitler, proteinin yapısında inaktif olarak bulunurlar. Özellikle biyoaktif peptitlere, süt ve yumurta zengin kaynak oluştursa da bu peptitler ayrıca, çoğu bitkiler ve çeşitli et türlerinde bulunmaktadır. Çeşitli kaynaklardan biyoaktif peptit üretimi üzerine artan ticari ilgi mevcuttur (Korhonen ve Pihlanto, 2003).

Süt; bebek ve yetişkinler için önemli besin bileşenlerini içeren, biyolojik olarak aktif bileşenlerin kaynağıdır. Bu biyoaktif bileşenlerin içeriğinde biyoaktif peptitlerle birlikte kalsiyum, folik asit, B₆ (piridoksin) ve B₁₂ (siyanokobalamin) vitaminleri ile konjuge linoleik asit yer almaktadır (Preuffer ve Schrezenmeir, 2000).

Uzun zamandır süt proteinleri esansiyel amino asitler gibi sadece besleyici bileşenlerin kaynağı olarak bilinirken (Hambræus, 1992). Son yıllarda çeşitli araştırmalar, biyoaktif peptitlerin amino asit sekanslarına bağlı olarak süt proteinlerinin besinsel ve fonksiyonel olarak önemli bir kaynak olduğunu ve çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olabileceğini göstermiştir (Leónil vd., 2000). 1979'dan itibaren yapılan araştırmalarda süt proteini orijinli biyoaktif peptitler tanımlanmıştır (Meisel, 1998). Bu peptitler temel protein içerisinde inaktif formda bulunur ve gastrointestinal sistemde taşınması sırasında sindirim enzimleri tarafından parçalanarak ya da fermentasyon veya olgunlaştırma işlemi olan gıda prosesleri sırasında meydana gelir (Kitts ve Weiler, 2003). Laktik asit bakterileri kaynaklı proteolitik enzimler, süt proteininden biyoaktif peptitler oluşmasında önemli bir rol almaktadır (Korhonen, 2009).

α_{s1} -Kazein ve β -kazein sütte büyük oranda bulunan önemli proteinlerdir ve bu proteinler proteolize karşı duyarlıdır. Sırasıyla protein dizilerinde 199 ve 209 amino asit bulunması ile birlikte, bu proteinler 20.000'den fazla farklı peptiti meydana getirme kapasitesine sahiptir (Yamamoto ve Takano, 1999). Biyoaktif peptitler kazeinlerin ve peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizi ile meydana gelebilmektedir (Meisel, 1998). Biyoaktif peptitler ayrıca sütün işlenmesi sırasında yer alan enzimler tarafından meydana gelebilmektedir

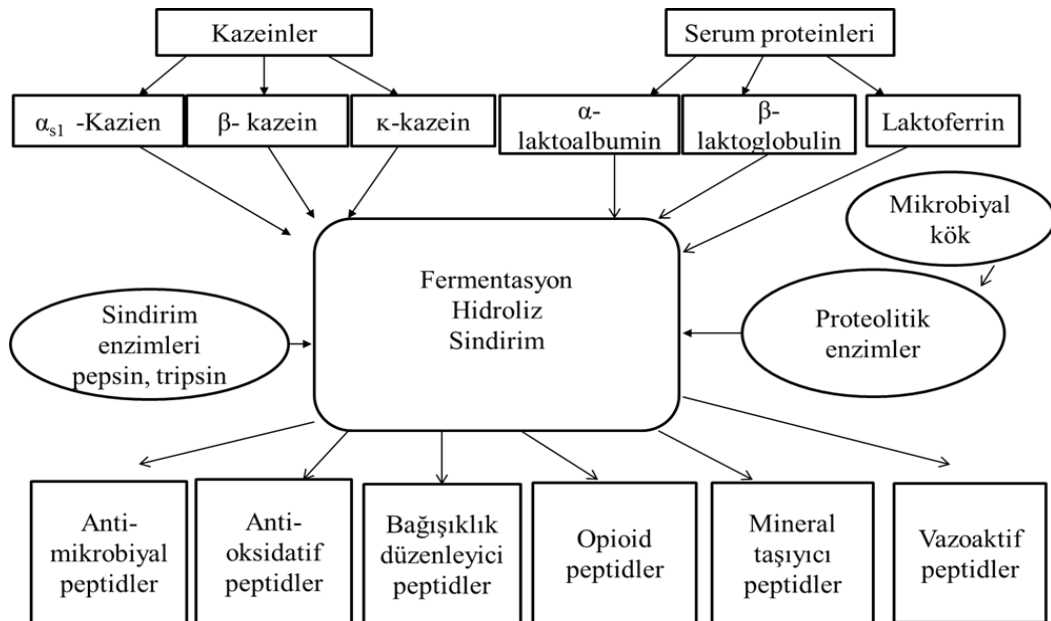
(Gobbetti vd., 2002). Olgunlaşmış peynirlerin bazı tipleri doğal olarak fonksiyonel peptitlerin olduğu gıdalara örnek olarak verilebilir. Çünkü bazı biyoaktif peptitler peynir kültüründe bulunan mikrobiyal enzimlerin proteoliz aktivitesi ile doğal olarak meydana gelebilmektedir (Meisel, 2004). Ancak çok uzun süren olgunlaşma periyodunda ileri proteoliz reaksiyonundan dolayı açığa çıkan biyoaktif peptitler inaktif olabilir (Meisel vd., 1997). Örneğin orta düzeyde olgunlaştırılmış Gouda peynirinin, çok daha uzun süre olgunlaştırılmış Gouda peynirine göre iki kat daha fazla ACE-inhibitörü aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (Smacchi ve Gobbetti, 2000).

Süt ürünlerindeki proteinlerden ve oligopeptitlerden meydana gelen biyoaktif peptitlerin oluşumu sindirim esnasında da gerçekleşebilir (Hernandez-Ledesma vd., 2004). Gastrointestinal sistemde, uzun yapıdaki oligopeptitler sindirim enzimleri tarafından biyoaktif peptitlerin oluşmasını sağlayacak şekilde ileri derecede parçalanır (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Ancak, intestinal proteinazlar ya da bağırsaktaki fırçamsı yüzeye ait peptidazlar tarafından ileri derecede sindirimi ile kısmen hidrolize olmuş biyoaktif peptitlerin biyolojik aktivitesi azalabilir ya da sınırlanabilir (Meisel ve Bockelmann, 1999).

Sağlık üzerinde sayısız etkileri ve fermente olmuş süt ürünlerinin fonksiyonel özellikleri, süt bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal modifikasyonuna neden olan mikroorganizmalara bağlıdır. Bu noktada laktik asit bakterileri önemli bir rol oynamaktadır. En önemli metabolik aktivite, süt fermentasyonunda proteoliz süresince meydana gelir. Proteoliz, laktik asit bakterilerinin ortamda gelişmesini sağlar ve sonuçta fizyolojik olarak aktif peptitlerin meydana gelme potansiyelini etkileyebilir. Mikrobiyal proteoliz oldukça spesifiktir ve çoğu güçlü biyoaktif peptitin meydana gelmesine neden olur. Süt proteinlerinin peptit yapısı, biyoaktif peptitlere potansiyel bir kaynak olabilecek mikrobiyal fermentasyondan sonra önemli ölçüde farklılık gösterir (Chabance vd., 1998). Fermente süttten elde edilen biyoaktif peptitler normal süttten elde edilen biyoaktif peptitlere göre daha etkilidir (Sipola vd., 2001). Peynirin olgunlaşması sırasında meydana gelen ikincil proteoliz, diğer biyoaktif peptitlerin oluşmasına neden olabilir ve bu peptitlerin biyoaktivitesi peynirin olgunlaşma aşamasına bağlı olarak değişmektedir (Meisel vd., 1997). Dolayısıyla fermente edilmiş süt ürünleri, süte göre daha fazla biyoaktif peptit bileşeni içermektedir. Bu nedenle biyoaktif peptit kaynağı olan gıdaların büyük bir bölümünü fermente edilmiş süt ürünleri oluşturmaktadır. Çizelge 2.1.'de çeşitli peynir tiplerinde ve fermente süt ürünlerinde tanımlanmış biyoaktif peptitler gösterilmiştir.

Peynir olgunlaşması boyunca meydana gelen peptitlerin biyoaktiflik özelliği, proteolitik sistem tarafından parçalanması sonucu oluşan yapı ile ilişkilidir (Muehlenkamp ve Warthesen, 1996; Sabikhi ve Mathur, 2001; Butikofer vd., 2007; Butikofer vd., 2008). Olgunlaşma sırasında meydana gelen ikincil proteoliz, diğer biyoaktif peptitlerin oluşmasına öncüllük eder. Meydana gelen biyoaktif peptitlerin çeşidi peynirin olgunlaşma derecesine bağlı olarak değişiklik gösterir. Genellikle peynirin olgunlaşması süresince aktif peptit konsantrasyonu artar (Meisel vd., 1997; Saito vd., 2000; Ryhänen vd., 2001).

Sütten elde edilen peptitlerin sadece fermentasyonla meydana gelmediği ayrıca süt proteinlerinin enzimlerle hidroliz ve gastrointestinal sistemde sindirimi sonucunda oluştuğu Şekil 2.1’de görülmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2004). Çizelge 2.1’de ise farklı peynirlerden ve süt ürünlerinden izole edilen biyoaktif peptitler yer almaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Proteinlerin gastrointestinal enzimler tarafından vücut içinde sindirimiyle vücutta ACE inhibisyonunu sağlayan antihipertansif peptitler oluştuğu tespit edilmiştir (Nakamura vd., 1996; Nakamura vd., 1995a). Yapılan çalışmalarda fermente süt ürünlerinde yaygın olarak bulunan peptitlerden Val-Pro-Pro (VPP) ve Ile-Pro-Pro (IPP). ACE-inhibitör peptit özelliği gösterdiği ve hipertansif hastaların kan basıncını azalttığı görülmüştür (Seppo vd., 2003).



Şekil 2-1 Süt proteinlerinin proteolizi sonucu meydana gelen biyoaktif peptitler

Çizelge 2.1 Çeşitli peynir tiplerinde ve fermente süt ürünlerinde tanımlanmış biyoaktif peptitler

Ürün	Tanımlanmış biyoaktif peptit örnekleri *	Biyoaktivite	Referanslar
<i>Peynir tipi</i>			
Parmigiano–Reggiano	β -kn f(8–16). f(58–77). α_{s2} -kn f(83–33)	Fosfopeptitler, β -kazomorfin prekürsörleri	Addeo vd. (1992)
Cheddar	α_{s1} - ve β -kazein fragmentleri	Çeşitli fosfopeptitler	Singh vd. (1997)
İtalyan çeşitleri: Mozzarella, Crescenza, Italico, Gorgonzola	β -kn f(58–72)	ACE inhibitörü	Smacchi ve Gobetti (1998)
Gouda	α_{s1} -kn f(1–9). β -kn f(60–68)	ACE inhibitörü	Saito vd. (2000)
Festivo	α_{s1} -kn f(1–9). f(1–7). f(1–6)	ACE inhibitörü	Ryhänen vd. (2001)
Emmental	α_{s1} ve β -kazein fragmentleri	Bağışıklık sistemini uyarıcı, çeşitli fosfopeptitler, antimikrobiyal	Gagnaire vd. (2001)
Manchego	Koyuna özgü α_{s1} -, α_{s2} - ve β -kazein fragmentleri	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz vd. (2002)
Emmental	Aktif peptit tanımlanmamış	ACE inhibitörü	Parrot vd. (2003)
<i>Fermente edilmiş sütler</i>			
Ekşi süt	β -kn f(74–76, f(84–86). κ -kn f(108–111)	Antihipertansif	Nakamura vd. (1995)
Yoğurt (koyun sütü)	Aktif peptit tanımlanmamış	ACE inhibitörü	Chobert vd. (2005)
Dahi	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	ACE inhibitörü	Ashar ve Chand, (2004)

*Kısaltmalar: α_{s1} -kn = α_{s1} -kazein, β -kn = β -kazein, κ -kn = κ -kazein.

Süt, besin değerinin yanısıra içerdiği kazein ve serum proteinleri gibi biyolojik olarak aktif bileşenler sayesinde insan sağlığı ve metabolizması üzerinde biyokimyasal, fonksiyonel ve fizyolojik etkiler göstermektedir (Shanbacher vd., 1998). Ayrıca sütteki diğer biyoaktif bileşenler; immunoglobulinler, antibakteriyel peptitler, antimikrobiyal peptitler, oligosakkaritler ve bunlara ek olarak minör bileşenler insanları hastalıklara karşı korumaktadır (Haenlein ve Caccese, 1984; Park, 1990, 2006).

Sütün doğal yapısında bulunan bileşenlerin dışında, fermentasyon sonucu oluşan antimikrobiyal, antioksidan, immunomodulator, antihipertansif, antistotoksik, opioid ve mineral bağlayıcı özellik gösteren birçok biyoaktif peptit belirlenmiştir. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler, süt proteinlerinin amino asit dizilerinde tespit edilmiştir. Bu peptitlerin, sütün doğasında bulunan mikrobiyal, pıhtılaştırıcı, sindirim enzimleri ve dışarıdan katılan starter laktik asit bakterileri tarafından ortaya çıkarılabileceği görülmüştür (Gobbetti vd., 2002).

Angiotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) bir ekzopeptidazdır ve çeşitli peptit substratlarının C-terminal uçlarından dipeptitleri açığa çıkarmaktadır (Schanbacher vd., 1998; Pihlanto-Leppala, 2001). ACE klasik olarak periferel kan basıncını düzenleyen renin-angiotensin sistemi ile ilişkili bir enzimdir (Meisel vd., 1997). ACE, angiotensinden açığa çıkarılan angiotensin-I'i kuvvetli damar daraltıcı, angiotensin-II'ye renin ile dönüştürerek kan basıncını arttırmaktadır (Kınık ve Akbulut, 1994; Schanbacher vd., 1998). ACE ayrıca damar genişletici (vasodilative) bradykinin enzimini parçalamakta ve adrenal kortekste aldosteronun açığa çıkmasını da teşvik etmektedir (Kınık ve Akbulut, 1994; Clare ve Swaisgood, 2000). ACE inhibitör peptitler ise, bu etkileri inhibe ederek kan basıncını düzenlemektedir (Schanbacher vd., 1998; Pihlanto-Leppala, 2001).

Günümüzde kazein ve serum proteini kaynaklı birçok ACE inhibitör peptit tanımlanmıştır. Örneğin α -laktoalbuminin pepsin ile muamelesi sonucu ortaya çıkan 50-53. fragment ile, tripsin ve kimotripsinle muamele sonucu 50-52. fragmentlerin ACE inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Pihlanto-Leppala, 2001). Yine α_{s1} -kazeinin peptit zincirindeki 23-24., 23-27. ve 194-299. fraksiyonları β -kazeinin 177-183. fraksiyonları ve κ -kazeinin 63-65. fraksiyonlarında ACE inhibitörü olduğu ve kasokininler olarak isimlendirildiği tespit edilmiştir (Schanbacher vd., 1998; Clare ve Swaisgood, 2000; Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2000).

Biyoaktif peptitler, gastrointestinal sistemde epitel membranlardan absorbe edilir ve buradan da kan akışı yoluyla hedef organlara ulaşarak biyolojik etkilerini gösterirler (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Di- ve tri-peptitler gibi kısa zincirli peptitlerin sindirim enzimleri ile ileri derecede hidrolize uğramadan kolaylıkla bağırsakta absorbe edildiği ve hedef organa ulaştığı bildirilmiştir (Meisel ve Bockelmann, 1999; Shah, 2000).

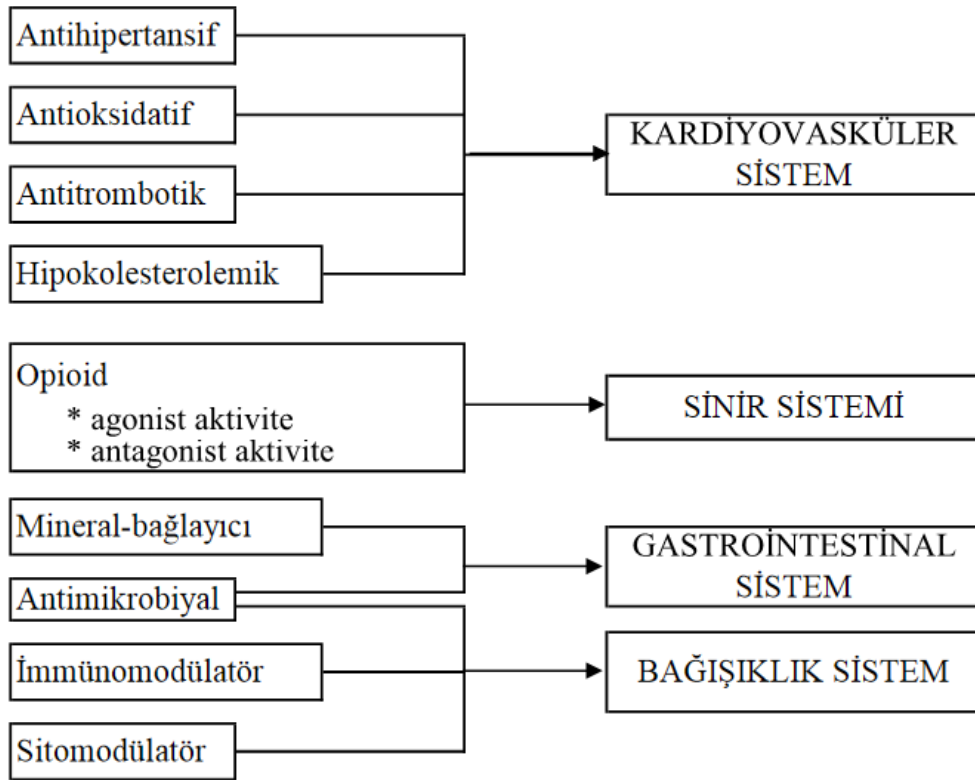
Süt proteini orijinli biyoaktif peptitler, vücutta çeşitli proseslerin düzenleyicileri olarak faaliyet göstermektedir. Ayrıca çoğu süt orijinli biyoaktif peptit, multifonksiyonel özellikler taşımaktadır. Örneğin opioid peptitler, agonistik ya da antagonistik aktiviteler gösteren opioid reseptör ligandlarıdır. ACE-inhibitörü peptitler, antihipertansif etki gösterebilir. Mohanty vd. (2016) süttten biyoaktif peptidler üretmenin en yaygın yöntemi protein moleküllerinin enzimatik hidrolizi olduğunu, bunun için sindirim enzimleri ile alkalaz, kimotripsin, pepsin ve termolisin gibi farklı proteinazların kombinasyonları ve ayrıca bakteriyel ve fungal kaynaklı enzimlerin kullanıldığını belirtmişlerdir. Biyoaktif peptitlerin içeriği ve profili; çalışılan matrikse ve kullanılan yöntemle göre farklılık gösterdiğinden hedeflenen peptitlerin salınması ve elde edilmesinde fermantasyon işlemleri ve enzimlerin kullanımının üstün kontrol sağlamaktadır (Lorenzo vd., 2018).

Bağıışıklık sistemini düzenleyici kazein, insan vücudundaki lenfositlerin çoğalmasını ve makrofajların fagositik aktivitelerinin artmasını düzenleyen peptitlerdir. Antimikrobiyal peptitler ise duyarlı mikroorganizmaları yok eder. Antitrombotik peptitler, trombosit yüzeyleri üzerindeki belirli reseptör bölgelere fibrinojenin bağlanmasını engeller ve ayrıca trombositlerin pıhtılaşmasını önler. Kazeinofosfopeptitler (KFP), çözünebilir organofosfat tuzları oluşturabilirler ve özellikle kalsiyum olmak üzere çeşitli minerallerin taşıyıcısı olarak fonksiyon gösterebilirler. Biyoaktif peptitlerin fonksiyonlarının çeşitliliği, bağırsak sistemindeki ya da emilimi gerçekleştikten sonra periferik (çevresel) organlardaki hedef alanlara (reseptörler, enzimler gibi) olan etkisinden kaynaklanır (Meisel, 1997).

Fizyolojik bazı biyoaktif etkiler tek bir komponente bağlı iken, bazı biyoaktiviteler komponentlerin ortak etkisi sonucu oluşmaktadır. Bu bağlamda, biyoaktif peptitlerin biyoaktivitelerini tam olarak gösterebilmesi için diğer bazı peptitler ve peptit olmayan diğer komponentler ile interaksyona girmesi gerekebilmektedir. Yani bazı biyoaktiviteler farklı bileşenlerin sinerjik etkisinin bir sonucu olarak gerçekleşmektedir (Schanbacher vd., 1998).

Şekil 2.2.'de biyoaktif peptitlerin çeşitleri ve vücut sistemleri üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Bu bölümde biyoaktif peptitleri sınıflandırarak sağlık

açısından fonksiyonlarının değerlendirilmesi ve bu fonksiyonları gerçekleştirdiği etki mekanizması hakkında bilgi verilmiştir.



Şekil 2-2 Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları

Sütün fermentasyonu sonucu oluşan ve son yıllarda farklı tekniklerle elde edilen bu peptitlerin fonksiyonel gıdalara katıldıkları görülmüştür. Bu nedenle fonksiyonel gıdalar ve biyoaktif bileşenler gıda bilimcileri, beslenme uzmanları, sağlık profesyonelleri ve tüketicilerin dikkatini çekmeye başlamıştır. Fonksiyonel gıdalar, geleneksel ürünlere benzerliğinin yanı sıra çeşitli fizyolojik yararları olduğu ve temel fonksiyonlarının ötesinde kronik hastalık risklerini azalttığı tespit edilmiştir. Fonksiyonel gıdaların gıda piyasasındaki satışları düzenli olarak arttığı ve fonksiyonel gıda piyasasının toplam gıda piyasasının %5'ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Ticaret hacmi 50 milyar doları aşmış olan, fonksiyonel gıdalar Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ülkeleri ve Japonya gibi gelişmiş ülkelerde hem miktar hem de çeşitlilik yönüyle sürekli artan oranlarda tüketilmektedir (Menrad, 2003; Stanson vd., 2005). Türkiye'de ise 2005 yılı itibariyle bu tür ürünlerin miktar ve çeşitliliğinde gözle görülür bir artış olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde fonksiyonel gıdaların pazar değerinin, 1998'de 28.9 milyar dolardan, 2007 yılında 37.7 milyar seviyesine yükseldiği bilinmektedir (Seçim, 2018).

Küfle olgunlaştırılan Camambert peynirinde maksimum olgunlaşma kalitesi düzeyine 30 gün içerisinde ulaşılırken, 60. günden sonra büyük kalite kaybı meydana gelmektedir. Yine geleneksel yöntemle üretilen Cheddar ve Gouda peynirleri için en uygun tüketim zamanları sırasıyla 5-7 ay ve 8-12 aydır (Walstra vd., 1999). Yerli peynirlerimizden Beyaz peynir yaklaşık 3 ay, Kaşar peyniri ise 6 ay sonra ideal olgunlaşma karakteristiklerine kavuşmaktadır. Bu örneklerden hareketle, hızlı olgunlaştırma yöntemlerinin özellikle uzun olgunlaştırma süresi gerektiren peynir çeşitlerinde, ön koşulları yerine getirmesi ve olgunlaşma süresini belirli sürelerde kısaltması gibi uygulamaların hedeflerine ulaşması açısından gereklidir.

Peynirde olgunlaşmayı hızlandırmak amacıyla, peynir bulamacının pıhtıya ilavesi uzun yıllardır bilinen bir uygulamadır. Bu yöntem ilk kez Kristofferson vd. (1967) tarafından tanımlanmış ve Singh ve Kristofferson (1972) tarafından modifiye edilmiştir. Peynir bulamacı su, peynir pıhtısı ve tuz karışımından oluşmaktadır ve nem içeriği %40-60 arasında değişmektedir (Wilkinson ve Kilcawley, 2005). Peynir bulamacı ilavesi ile olgunlaşma süresi %25'e kadar kısalabilmektedir. Bulamaca proteinaz, lipaz ya da iz elementlerin ilavesi ile bu süreç daha da kısaltılabilmektedir (Abdel Baky vd., 1982).

Peynir bulamacı sistemi ile peynirde olgunlaşmanın hızlandırılması ve diğer etkileri üzerine yapılan çalışmalara ilişkin literatüre bakıldığında; cheddar peynir üretiminde 10 kg pıhtıya 600 g bulamaç ilavesi ile olgunlaşma süresi %25 kısaldığı (Dulley, 1976), peynir bulamacı ile enzim ve iz element karışımı kullanılan Ras peynirinde olgunlaşma hızlandığı (Abdel Baky vd., 1982), Blue peynir pıhtısına %2 oranında Roqueforti peynir bulamacı katkısı ile olgunlaşma periyodunun kısaldığı ve tat kusurunun oluşmadığı belirlenmiş (Rabie, 1989) ve olgunlaşmanın takip edildiği Edam peynir üretiminde kullanılan % 0.5, 5.0 ve 10.0 oranlarında peynir bulamacı ilave edildiği, %10 peynir bulamacı ilavesinin olgunlaştırmayı hızlandırdığı görülmüştür (Salam vd., 1989).

Taze yumuşak Beyaz peynir üzerine yapılan bir çalışmada; olgunlaştırılan keçi peyniri bulamacı %1, 3 ve 5 oranlarında katılmıştır. Peynir bulamacı ilavesi, olgunlaşmamış peynirlerde aromayı geliştirmiş ve pürüzsüz tekstür oluşumunu sağlamıştır (Abbas vd., 1993).

Olgun Ras peynir bulamacının %1, 3 ve 5 oranlarında Domiati peynir üretiminde kullanıldığı bir çalışmada ise; kullanılan bulamaç ile proteolitik ve lipolitik bakteriler üzerinde aktiviteyi teşvik edici rol oynamış ve olgunlaşma periyodu kısalmıştır (El Sayed vd., 1993).

Accelase AHC50 enziminin 24 saatlik Cheddar peynir bulamacında kullanılması ile aroma gelişimi hızlanmıştır (Ramasamy vd., 1999).

Peynir bulamacı katkısı ile olgunlaşma süresinin en iyi hızlandırılmasına örnek olan çalışmalardan biri de Pecorino Umbro peyniridir. Bulamaç kullanımı ile olgunlaşma periyodu 60 günden 28 güne kısalmıştır. Bunun yanında herhangi bir tat ve aroma kusuru oluşmamıştır (Corsetti vd., 1998).

UF-Ras peynir pıhtısına 24 saatlik Ras peynir bulamacının %2 oranında katkısı ile peynir aroma, yapı ve tekstür gibi unsurlarda iyileşme olmuş, olgunlaşma süresi kısalmıştır (Mostafa vd., 2000).

Yüksek basınç uygulaması ve peynir bulamacı sisteminin kombine kullanıldığı bir çalışmada ise; 345-550 MPa basınç altında 10-30 dakika yüksek basınca tabii tutulan peynir bulamacının İsviçre tipi peynir üretiminde kullanılması, istenilenin aksi sonuçlar vermiştir. Yüksek basınç uygulaması ya da uygulama süresi aroma gelişimini yavaşlatmıştır (Ding vd., 2001).

15, 30 ya da 45 gün olgunlaştırılan peynirlerin bulamaç olarak kullanıldığı çalışmada peynir üretiminde en iyi sonucu 30 °C’de 30 gün olgunlaştırılan peynir bulamacı vermiştir (Suarez-Solis vd., 2002).

El Sisi (2002) tarafından %2 Blue peynir bulamacının Domiati peynir üretiminde kullandığı çalışmasında olgunlaşma hızlanmıştır. Ras peynirinde %3 peynir bulamacı ilavesi ile en iyi duyu özellikler %20-23 tuz içeren salamura çözeltisi ile elde edilmiştir (El Sisi, 2003).

Cheddar peyniri pıhtısına bulamacın sprey kurutma ile elde edilmiş tozunun ilavesi ile kontrol örneğine kıyasla 2 aylık olgunlaşma hızlanmıştır (Hannon vd., 2004).

Çalışmada peynir bulamacı olarak bir küfle olgunlaşan peynir çeşidinin tercih edilmesinin temelinde küflerin yüksek biyokimyasal aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Bu aktiviteler sonucu oluşan bileşenler peynirin karakteristik tat ve kokusundan sorumludur. Küfler diğer peynir çeşitlerine kıyasla, peynirde daha kompleks bir olgunlaşma sağlamaktadırlar. Diğer peynir çeşitlerine kıyasla küflü peynirlerde proteoliz ve lipoliz daha ileri düzeyde olmaktadır (Molimard ve Spinnler, 1996; Viljoen vd., 2003).

Küfle olgunlaşan peynirlerde proteoliz diğer peynirlere göre yoğundur. Hem endopeptidaz ve hem de ekzopeptidaz aktivitelerinden dolayı, olgunlaşma süresince düşük ve yüksek molekül ağırlıklarına sahip peptit ve serbest amino asit birikimi oluşmaktadır (İsmail ve

Hanson, 1972). Uçucu olmayan aminler dekarboksilasyonu yoluyla oluşmaktadır (Joosten, 1988). Amino asit parçalanması sonucu amonyak (fazla olursa amonyum laktat-acı tat kusuru nedeni), aldehit, asitler, ketonlar, aminler, metantiyol-sarımsak gibi ürünler ortaya çıkmaktadır. Yüzeyi küfle olgunlaşanlarda iç kısımlara enzim nüfuz edemediğinden iç kısmı bakteriyel olarak olgunlaşan peynirlerle benzerlik gösterirler. Diğer bir ifade ile yüzeyde iç kısma oranla proteoliz daha belirgindir.

Proteoliz gibi lipoliz de diğer peynirlere kıyasla küflü peynirlerde daha yoğundur. Gouda, Gruyère ya da Cheddar gibi sert peynirlerde oluşan serbest yağ asitleri miktarı, toplam trigliseritlerin %2'sinden fazla olmamasına karşın, bu oran küflü peynirlerde %2 ile %20 arasındadır. Ancak bu peynirlerde pH değerinin yüksekliği yağ asitlerinde nötralizasyona neden olduğundan aşırı lipoliz ransit tat kusuru yaratmamaktadır. Yağ asitleri hem aromaya katkıda bulunmakta hem de metil ketonlar, alkoller, laktonlar ve esterlerin oluşumu için öncül maddeler olarak değerlendirilmektedir (Hayaloglu ve Özer, 2011).

Bunun yanı sıra, küflü peynir üretim ve olgunlaşma prosesleri çok kompleks olduğundan, peynirlerin kalitesi ve bileşimi arasındaki ilişki tam anlamıyla aydınlatılamamıştır.

Literatüre bakıldığında Konya küflü peynir olgunlaşması üzerine çalışmalar sınırlı sayıdadır. Konya'da, yağı alınmış koyun sütünden üretilen ve doğal olarak küflendirilen Konya küflü peyniri, genellikle Karapınar, Ereğli, Cihanbeyli gibi koyuncululuğun yoğun olduğu yerlerde üretilmektedir. Yağının alınması, doğal küflenmeye yol açtığı için aflatoksin oluşmasını önlemektedir.

Doğal küflenme yoluyla olgunlaştırılan bu peynir üzerine mikrobiyal çalışmalar bulunmaktadır. Konya ve civarı küflü peynirlerde küf florasının araştırılması konulu yapılan çalışmada küflü peynir örneklerinden izole edilen küflerin tümü *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait türlerdir. İzolatların %87.16'sını *Penicillium*, %12.84'ünü ise *Aspergillus* cinsi türler teşkil etmiştir (Çizelge 2.2). Konya ve yöresi küflü peynir örneklerinden izole edilen tüm küflerin yarıyan yakın kısmında *P. roqueforti* dominant tür olarak belirlenmiştir (Özkalp ve Durak, 1995).

Çizelge 2.2 Konya ve civarı küflü peynir örneklerinden izole edilen küfler

Küfler	İzolat Sayısı	% Oranı
<i>Penicillium roqueforti</i>	127	42.91
<i>P. verrucosum var. cyclopium</i>	66	22.30
<i>P. camemberti</i>	15	5.07
<i>P. brevicompactum</i>	14	4.72
<i>P. chrysogenum</i>	14	4.72
<i>P. frequentans</i>	12	4.05
<i>P. echinulatum</i>	10	3.37
<i>Aspergillus flavus</i>	25	8.45
<i>A.versicolor</i>	13	4.39
Toplam	296	100.00

30 adet küflü peynir örneklerindeki mikrobiyal özellik ve yapısı üzerine yapılan bir çalışmada 24 farklı küf türü izole edilmiştir. *Penicillium commune*, *P. roqueforti*, *Geotrichum candidum* ve *P. verrucosum* baskın çeşit olarak izole edildiği ve *Penicillium* türlerinin %70.25 oranında olduğu görülmektedir (Çizelge 2.3) (Hayaloglu ve Kırbağ, 2007).

Çizelge 2.3 Küflü peynir örneklerinden izole edilen küfler

Küfler	İzolât Sayısı	% Oranı
<i>Acremonium alternatum</i>	2	1.3
<i>Alternaria alternata</i>	3	1.9
<i>Aspergillus flavus</i>	1	0.6
<i>A. fumigatus</i>	7	4.4
<i>A. niger</i>	3	1.9
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	1.9
<i>C. herbarium</i>	2	1.3
<i>Geotrichum candidum</i>	13	8.2
<i>Mucor himealis</i>	3	1.9
<i>M. mucedo</i>	2	1.3
<i>Penicillium brevicompactum</i>	7	4.4
<i>P. chrysogenum</i>	9	5.7
<i>P. citrinum</i>	8	5.1
<i>P. commune</i>	16	10.1
<i>P. crustum</i>	6	3.8
<i>P. echinulatum</i>	8	5.1
<i>P. expansum</i>	10	6.3
<i>P. roqueforti</i>	14	8.9
<i>P. solitum</i>	8	5.1
<i>P. spinulosum</i>	5	3.2
<i>P. verrucosum</i>	15	9.5
<i>P. viridicatum</i>	5	3.2
<i>Rhizopus nigricans</i>	5	3.2
<i>Trichoderma harzianum</i>	3	1.9
Toplam	138	100.0

Geçmişte üretim izni bulunmadığından dolayı satış ve pazarlamada büyük sıkıntılar yaşanan küflü peynir, şimdilerde Konya ilimizdeki onaylı işletmelerde, güvenilir ham madde ve roqueforti kültürü kullanılması şartları ile belirli standartlarda ve hijyenik koşullarda

reilmeye başlamıştır. Konya ilinde hâlihazırda üretim izni alan 12 firmaya ait Konya yeşil peyniri ismi ile raflardaki yerini almaya başlamıştır (Anonymous, 2014).

Bu çalışmanın amacı basit ve uygulama alanı geniş olan peynir bulamacı ilavesi tekniği ile hücre dışı enzim aktivitesi yüksek olan Konya küflü peyniri bulamacının model peynir üretiminde kullanımına dayanmaktadır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Üretimde kullanılan süt

Araştırmada kullanılan inek sütü, Malatya ili Battalgazi ilçesinde faaliyet gösteren Korkmazlar Süt İşletmesinden temin edilmiştir. Sütler, sağımı takip eden en kısa sürede peynire işlenmiştir.

3.1.2. Peynir mayası

Buzağı şirdeninden üretilmiş peynir mayası Chr. Hansen İstanbul (Mandra Özel. 1/16.000 kuvvetinde) kullanılmıştır.

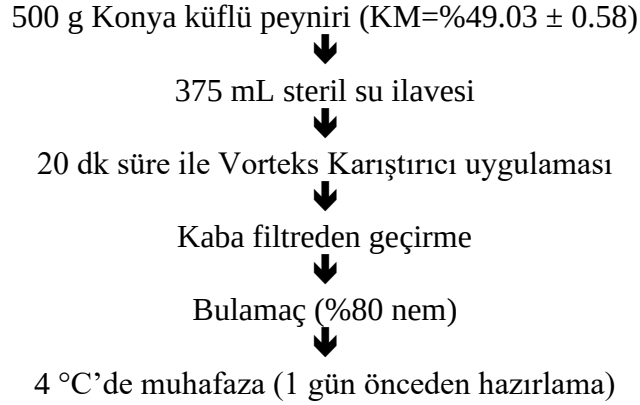
3.1.3. Tuz

Malatya’da satılan yenilebilir iyotsuz yemek tuzu kullanılmıştır.

3.1.4. Peynir bulamacı

Peynir bulamacı Castada vd. (2015) tarafından dizayn edilen peynir bulamaç sisteminden faydalanılarak, Konya küflü peynirinden bulamaç hazırlanmıştır. Bulamaç için Konya ili Karatay ilçesinde faaliyet gösteren İbrahim İlker Süt ve Süt Ürünleri firmasından Konya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü aracılığıyla temin edilen *Penicillium roqueforti* küfünün baskın olduğu yeşil peynir kullanılmıştır.

Bulamaç üretimi: *P. roqueforti* kültürü ile üretimi yapılan Konya yeşil peynirinin küflenmesi ve olgunlaşmasını tamamlayarak satışa sürüldüğü tarihten itibaren bir ay içerisinde temin edilen peynir kullanılmıştır. Model peynir üretiminin yapılacağı 1 gün öncesinde Şekil 3.1’de gösterildiği gibi bulamaç hazırlanmıştır.



Şekil 3-1 Bulamaç Hazırlanması

3.1.5. Ambalaj materyali

Üretilen model peynirler yaklaşık 50 gramlık porsiyonlarda silindirik biçimde kalıplanmış ve vakum ambalajlanmasında, kaşar peyniri vakum paketlenmesinde kullanılan Cryovac vakum poşetler kullanılmıştır.

3.2. Model peynir üretim yöntemi

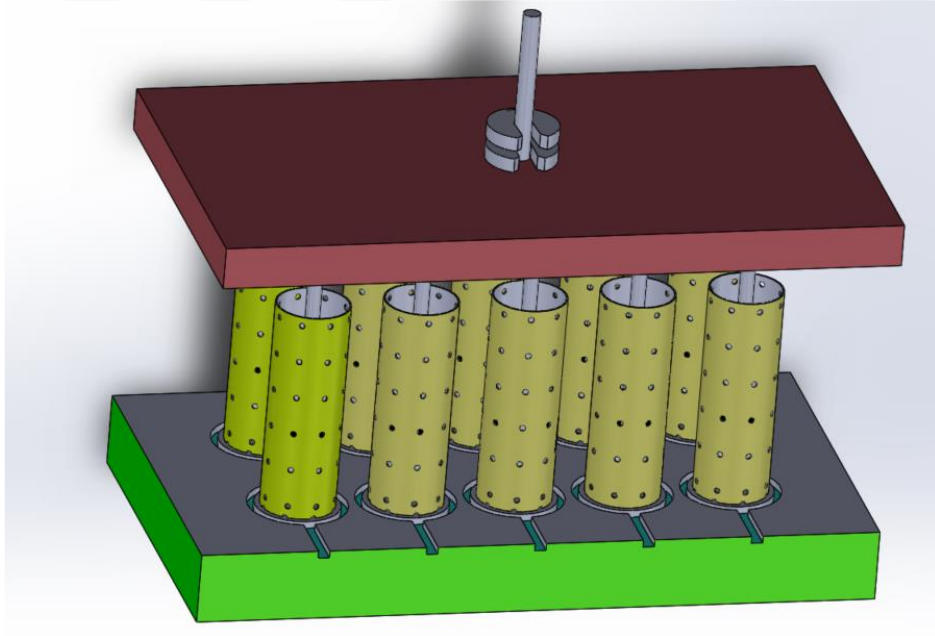
3.2.1. Deneme model peynir üretimi

Üretimde olgunlaşma sıcaklığı, tuz konsantrasyonu ve peynir bulamaç oranı faktörlerini incelemek için cevap yüzey yöntemine göre model peynir üretimi yapılmıştır (Hayaloglu ve Sahingil, 2016). Peynirde pıhtı içerisine tuz oranı %1, 2 ve 3 (w/w) ve teleme içerisine bulamaç oranı %0, 1, 3 ve 5 olacak şekilde ilave edilmiştir. Üretilen peynirler 30 gün olgunlaşma süresi boyunca olgunlaşma sıcaklığı ise 5 °C, 10 °C ve 15 °C olarak uygulanmıştır. Peynir üretimi İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Deneme model peynirleri % bileşimleri

Peynir Kodu	Tuz (%)	Bulamaç (%)	Dep.Sıc. (°C)	Peynir Kodu	Tuz (%)	Bulamaç (%)	Dep.Sıc. (°C)	Peynir Kodu	Tuz (%)	Bulamaç (%-gr)	Dep.Sıc. (°C)
1	1	0	5	13	1	0	10	25	1	0	15
2	1	1	5	14	1	1	10	26	1	1	15
3	1	3	5	15	1	3	10	27	1	3	15
4	1	5	5	16	1	5	10	28	1	5	15
5	2	0	5	17	2	0	10	29	2	0	15
6	2	1	5	18	2	1	10	30	2	1	15
7	2	3	5	19	2	3	10	31	2	3	15
8	2	5	5	20	2	5	10	32	2	5	15
9	3	0	5	21	3	0	10	33	3	0	15
10	3	1	5	22	3	1	10	34	3	1	15
11	3	3	5	23	3	3	10	35	3	3	15
12	3	5	5	24	3	5	10	36	3	5	15

Çizelge 3.1’de belirlenen bileşim oranlarında Şekil 3.2’de gösterilen baskı aparatı kullanılarak Şekil 3.3’de (Hayaloglu, 2015) önerildiği şekilde Model peynir üretimi yapılmıştır. Deneme model peynirlerinin üretimi 2 tekerrür gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-2 Peynir üretiminde kullanılacak özel süzme ve baskı aparatı



Şekil 3-3 Model peynir üretimi

3.2.2. Model peynir üretimi

Deneme model peynir örnekleri RSM ile deney dizaynı (Design Expert v.9.0) oluşturulmuştur. Buna göre peynir için; hangi tuz ve bulamaç oranında üretilip hangi sıcaklıkta olgunlaştırılacağı belirlenmiştir.

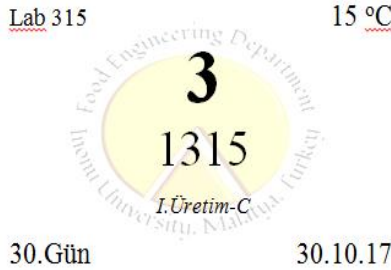
Deneme model peynir örnekleri 30 gün bileşim analiz değerleri ile WSN olgunlaşma indeks verileri Dizayn Expert programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Programın korelasyon verileri sonucu WSN sapma değerleri en düşük olan ve optimize olarak seçilen (program sonucuna göre) 15, 25, 27 ve 28 kodlu peynir örnekleri model peynir üretimine karar verilmiştir. Olgunlaştırma süresi 60 gün olarak belirlenmiştir. Analizler ise 1, 15, 30 ve 60. günler yapılmıştır.

Toplam iki üretim yapılarak peynirde pıhtı içerisine tuz oranı % 1 (w/w) ve teleme içerisine bulamaç oranı % 0, 3 ve 5 (w/w) olacak şekilde ana üretimler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Peynirler deneme üretiminde olduğu gibi vakum ambalajlar kullanılarak paketlenmiştir. Üretilen peynirler olgunlaşma sıcaklığı ise 10 °C ve 15 °C’de 60 gün süre ile depolanmıştır.



Şekil 3-4 Üretim sonrası vakum ambalajlama ve etiketleme fotoğrafı

Deneme ve ana üretim model peynir örneklerinin etiketlemede kod, örnek numarası, üretim, depolama sıcaklığı ve depolama süreleri ibareleri kullanılarak hangi peynir örneğinin muhafaza edileceği koşul ve hangi gün depolamadan çıkartılıp analizlerinin gününde yapılması için belirgin etiket formatı kullanılmıştır.



Analiz ve depolama günlerinin belirtir etiket sol alt köşesinde 1, 15, 30 ve 60. günler analiz ve depolama günleri belirtilmiştir (Şekil 3.5). Ana üretim 1, 15, 30 ve 60. gün bileşim, olgunlaşma ve duyu analizi tamamlanmıştır.

Şekil 3-5 Etiket örneği

3.3. Analiz yöntemleri

Örneklerin fiziksel ve kimyasal analizleri aşağıda belirtilen yöntemlere göre, her bir analiz iki üretim ve her üretim için en az iki paralel olarak çalışılmış ve ortalama sonuçlar $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

3.3.1. Titrasyon asitliği

Alkali titrasyon yöntemine göre yapılmıştır. Sonuçlar % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (AOAC. 1990).

3.3.2. pH değeri

Stomacher poşetlerinde 10 gr rendelenmiş peynir ile 10 mL saf su karıştırılarak Stomacher cihazında homojen karışımın pH'ı, Seven Compact pH meter S220 Mettler Toledo model pH-metre ile ölçülmüştür (Hayaloglu, 2003).

3.3.3. Kuru madde

Belirli miktarlardaki örneklerin 100 ± 2 °C'de sabit tartıma ginceye kadar kurutulması ile gravimetrik olarak belirlenmiştir. Sonuçlar % (w/w) olarak ifade edilmiştir (IDF. 1982).

3.3.4. Yağ ve kuru maddede yağ

Örneklerin yağ oranları, 0–40 taksimatlı özel peynir bütirometreleri ile Gerber yöntemine göre yapılmıştır (Ardö ve Polychroniadou, 1999). Sonuçlar % (w/w) olarak ifade edilmiştir. Kuru maddede yağ oranı ise;

$$\% (w/w)_{\text{kuru maddede yağ}} = \% \text{ yağ} \times 100 / \% \text{ kuru madde}$$

eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.3.5. Tuz ve kuru maddede tuz

Tuz oranları Mohr titrasyon yöntemine göre hazırlanacak örneğin ayarlı 0.1N AgNO₃ ile titrasyonu sonucu belirlenmiştir (Bradley vd., 1993). Sonuçlar % (w/w) olarak ifade edilmiştir. Kuru maddede tuz oranı ise;

$$\% (w/w)_{\text{kuru maddede tuz}} = \% \text{ tuz} \times 100 / \% \text{ kuru madde}$$

eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.3.6. Protein ve kuru maddede protein

Protein oranları, yağ yakmaya tabi tutulan örneklerin mikro Kjeldahl yöntemi ile azot miktarlarının saptanması suretiyle bulunan azot miktarının. 6.38 faktörü ile çarpılması sonucu protein oranları hesaplanmıştır (IDF, 1993). Kuru maddede protein oranları ise;

$$\% (w/w)_{\text{kuru maddede protein}} = \% \text{ protein} \times 100 / \% \text{ kuru madde}$$

eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.3.7. Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının ayrılması

3.3.7.1. Suda çözünen azot miktarı

Stomacher poşetlerinde 20 g rendelenmiş peynir örneği 40 mL su ile karıştırılıp Stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Karışım 40 °C'deki su banyosunda 1 saat tutulmuş. 3000 × g'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, üst kısımdaki yağ uzaklaştırıldıktan sonra sıvı kısım filtre kağıdında (Whatman No. 113) süzülmüştür. Filtrattan 10 mL alınarak, standart mikro Kjeldahl yöntemi ile suda çözünen azot miktarı tespiti gerçekleştirilmiştir (Kuchroo ve Fox, 1982).

$$\% \text{ suda çözünen azot (w/w)} = \frac{[1.4 \times (V1 - V0) \times M \times F]}{m}$$

$V1 = \text{örnek için harcanan HCl. mL}$

$V0 = \text{kör denemede harcanan HCl. mL}$

$M = \text{HCnin standart volumetrik çözeltisinin molaritesi. M}$

$F = \text{HCl çözeltisinin faktörü}$

$m = \text{örnek miktarı. g}$

Suda çözünen azot oranının toplam azota oranı olarak ifade edilebilen olgunlaşma derecesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır (Hayaloglu, 2003).

$$\text{Olgunlaşma Derecesi} = \frac{\% \text{ suda çözünen azot}}{\% \text{ toplam azot}} \times 100$$

3.3.7.2. %12 Triklorasetik asitte (TCA) çözünen azot miktarı

Suda çözünen azot analizinde hazırlanan filtrattan 25 ml alınıp ve eşit hacimde %24'lük (w/v) TCA çözeltisi karıştırılarak (son TCA konsantrasyonu % 12 olacak şekilde) oda sıcaklığında 2 saat tutulmuştur. Daha sonra, karışım filtre kağıdından (Whatman No 113) süzülüp ve filtrattan 25 ml alınarak standart mikro-Kjeldahl metodu ile (Polychroniadou, Michaelidou ve Paschaloudis (1999) TCA'da çözünür kısmın azot içeriği tespit edilmiştir (Hayaloglu, 2003).

$$\% 12 \text{ TCA'da çözünen azot (w/w)} = \frac{[1.4 \times (V1 - V0) \times M \times F]}{m}$$

$V1 = \text{Örnek için harcanan HCl. mL}$

$V0 = \text{Kör denemede harcanan HCl. mL}$

$M = \text{HCL'in standart volumetrik çözeltisinin molaritesi. M}$

$m = \text{Örnek miktarı. g}$

$F = \text{HCl çözeltisinin faktörü}$

% 12 TCA'da çözünen azot cinsinden olgunlaşma derecesi ise, yukarıda elde edilen değerin toplam azota oranlanması ile hesaplanmıştır.

$$\text{Olgunlaşma Derecesi} = \frac{\% 12 \text{ TCA'da çözünen azot}}{\% \text{ Toplam azot}} \times 100$$

3.3.7.3. Kazein azot oranı

Toplam azot oranından suda çözünen azot oranının çıkarılması ile hesaplanmış ve sonuçlar % azot üzerinden ifade edilmiştir (Argumosa vd., 1992).

3.3.8. Peptit profillerinin belirlenmesi

3.3.8.1. %70 Etanolde çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlar

20 mL suda çözünen fraksiyon ile 46.7 mL susuz etanolde karıştırılmıştır. Böylece, suda çözünen fraksiyon etanolde çözünen (daha küçük molekül ağırlıklı ve hidrofilik peptitler) ve etanolde çözünmeyen (daha büyük molekül ağırlıklı ve hidrofobik peptitler) alt fraksiyonlara ayrılması sağlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında (~21 °C) 30 dk tutulmuştur. Daha sonra soğutmalı (+4 °C) bir santrifüjde (Hettich model 320 R Tutlingen. Germany) 3000×g'de 30 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen filtrat Whatman No. 1 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Karışımdaki etanol bir rotary evaporatör (Model Hei-VAP Precision Heidolph. U.S.A) kullanılarak vakum altında 30 °C'de uzaklaştırılmıştır. Pellet (etanolde çözünmeyen peptitleri içeren fraksiyonlar) suda disperse edildikten sonra peptit analizi için liyofilizatörde (Freeze Dryer, Armfield) dondurularak kurutulmuştur.

3.3.8.2. Ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi ile peptit profillerinin belirlenmesi

Suda çözünen fraksiyonların peptit analizleri Shimadzu LC 20 AD Prominence HPLC (Shimadzu Corporation. Kyoto, Japan) kullanılarak RP-HPLC ile belirlenmiştir. Ayırma işlemi için 250× 4.6 ×5 µm. 300 Å gözenek boyutlu Jupiter C18 kolon (Phenomenex Co. Torrance, CA.USA) kullanılmıştır.

RP-HPLC'de kullanılan çözeltiler:

A; %0.1 (v/v) trifloroasetik asit (TFA, Sigma, St Louis, USA) HPLC kalitesindeki deiyonize suda (Milli-Q system, Waters Corp., Milshem. France).

B; %0.1 (v/v) TFA, asetonitrilde (Fluka ≥ 99.5 Sigma-Aldrich Chemie, CH-9471 Buchs. USA) hazırlanmıştır. Çözeltinin akış hızı 1.0 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır.

Örneklerin analizi: Dondurarak kurutulmuş suda çözünen, %70 etanolde çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlardan 10 mg tartılarak ve 1 mL (A) çözeltisinde çözündürülmüştür. Daha sonra 0.45 selüloz asetat filtreden (Sterlitech Corp. WA. USA). geçirilmiş ve bu filtrattan 40 µL örnek sisteme enjekte edilmiştir. Akış programı Çizelge 3.2'de olduğu gibi

yapılmıştır. Kromatografi ölçümü 214 nm’de yapılmıştır. Dedektör çıkışına bağlanan fraksiyon kolektörle Shimadzu FRC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan) peptitler fraksiyonlarına ayrılmıştır (Hayaloglu vd., 2004).

Çizelge 3.2 RP-HPLC analizinde (A) ve (B) çözeltilerinin kromatografi süresi içerisinde kolondan geçiş oranları

Süre (dk)	A çözeltisi (%)	B çözeltisi (%)
0	0	0
10	100	0
90	50	50
95	40	60
100	40	60
105	5	95
110	5	95
115	100	0
125	100	0

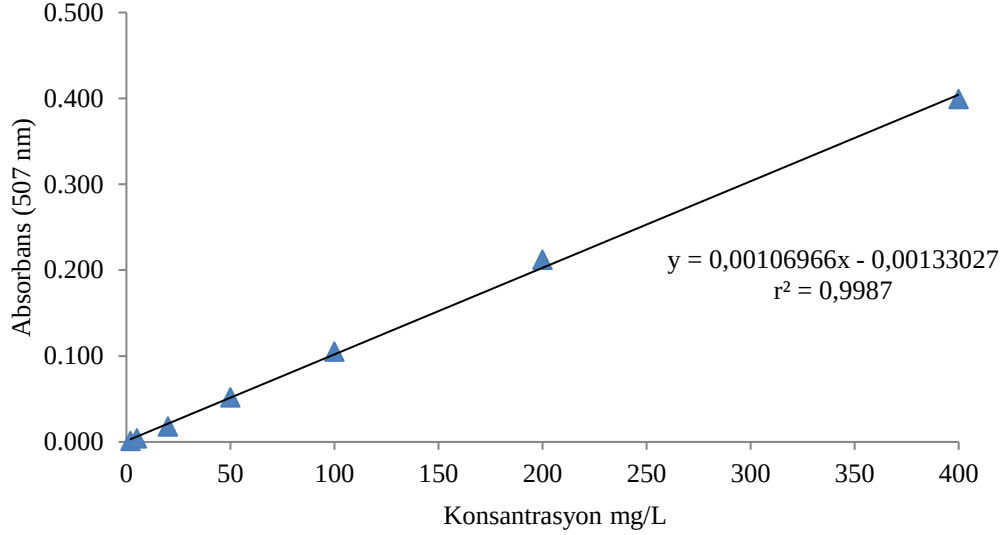
3.3.9. Toplam serbest amino asit miktarı

Analiz, Hayaloglu, (2007) tarafından uygulandığı gibi yapılmıştır. Cd-ninhidrin reaktifi ile hazırlanan örnekler 507 nm’de absorbans gerçekleştirilmiştir.

Reaktifler: Cadmium Ninhydrin reaktifi: 0.8 g ninhidrin, 80 mL ethanol ve 10 mL asetik asit karışımında çözündürülecek ve elde edilen karışıma 1 g CdCl₂ 1 mL suda çözündürülerek ilave edilmiştir.

Yöntem: suda çözünen azot tayininde elde edilen sulu ekstraktan 100 µL (beklenen serbest aminoasit miktarına göre) alınmış ve 900 µL suda çözündürülüp (toplam 1 mL olacaktır) üzerine 2 mL Cd-ninhydrin reaktifi eklenmiştir. Karışım 84 °C’ye ısıtılıp 5 dakika tutulduktan sonra soğutulmuş ve 507 nm’deki absorbansı UV-spektrofotometrede (Shimadzu. UV-1800, Japan) okunmuştur.

Örneklerin toplam serbest amino asit içerikleri, Şekil 3.6’daki denklemde gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda (x) hazırlanan Leu standardına karşılık 507 nm’de okunan absorbans değerleri (y) ile elde edilen standart eğriye göre peynirlerde bulunan toplam serbest amino asit miktarları mg Leu/kg peynir cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3-6 Farklı konsantrasyonlarda Leu standardına karşı elde edilen absorbans değerleri

3.3.10. Serbest amino asitlerin belirlenmesi

Dondurularak kurutulmuş suda çözünen azot örneklerinden 100 mg alınarak 2 mL santrifüj tüpüne 20 µL 40 mM metionin sülfon (iç standart) ilave edilmiştir. Bu karışıma 1 mL % 40 (w/v)'lik trikloroasetikasit (TCA) çözeltisinden ilave edilmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4±1 °C'de buzlu suda bekletilmiştir. Daha sonra süspansiyon Hettich 320R santrifüj ile 20 000 g × 10 dk 4±1 °C'de santrifüj edilmiştir. 25 µL deproteinize edilmiş süpernetant ependorf tüpü içerisine konularak vakum altında kurutulmuştur. Kurutulmuş örnek üzerine 20 µL eşleme tamponu: Metanol: 1 M sodyum asetat: TEA (2:2:1) ilave edilmiştir. Tekrar vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutulmuş örnek üzerine 20 µL türevlendirme çözeltisi: Metanol: TEA: Deiyonize su: PITC (7:1:1:1) ilave edilmiştir. İyice karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutulmuş örnek üzerine 1 mL örnek seyreltme tamponu ilave edilmiştir ve örnek 0.20 µm (CROMAFIL Xtra PVDF-20/25) filtreden geçirilerek 20 µL seyreltilmiş örnek HPLC kolonuna verilerek analiz edilmiştir.

Asidik, bazik ve nötral fizyolojik aminoasit karışım standartları ve metionin sülfon Sigma (St. Louis. MO. USA)'den satın alınmıştır. Fenilisotiyosiyonat (PITC) ve trietilamin ve diğer solventler HPLC derecesinde kullanılmıştır. Çalışılacak aminoasit standardı (100 mM) asidik ve nötral amino asit standardı ve bazik amino asit standardı 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Metionin sülfon solusyonu 0.4 mM son konsantrasyon olacak şekilde 0.1 M HCl ilave edilmiştir. Derivatization reaksiyonu (metanol, TEA, H₂O, PITC, 7:1:1.1. v/v/v/v) oranında günlük hazırlanmıştır. Çalışmada aminoasit standartları örneklerle

aynı uygulama yapılmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk reaksiyon süresi olarak tutulmuştur. Örnek ve standartlar HPLC de uygulanana kadar dondurucuda tutulmuştur. Derivatize örnekler % 5 asetonitril içeren (pH'sı asetik asitle 6.4'e ayarlanmıştır) 10 mM sodyum asetat tamponu ile çözündürülmüştür. Aminoasit seperasyonu Inertsil ODS-3. 3 μ m 4.6 $\times$ 150 mm kolonu (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m) kullanılarak. Shimadzu LC-20AD HPLC' de ters faz metod ile gerçekleştirilmiştir. Buffer A. 70 mM sodyum asetat (pH'sı asetik asitle 6.55'e ayarlanmış) % 2.5 asetonitril içerecek şekilde hazırlanmıştır. Buffer B. asetonitril: deiyonize su: metanol (9:8:3, v/v/v) oranında karıştırılarak ve her iki solvente 10 mg/L olacak şekilde disodyum etilendiamintetraasetik asit (Na₂EDTA) ilave edilerek hazırlanmıştır. 254 nm de 45 °C'de 1 mL/dk akış oranı ile 60 μ L kolona enjekte edilmiştir. Amino asit analizi Hayaloğlu vd. (2011a)'da tarafından uygulandığı gibi yapılmıştır.

3.3.11. Üre-Poliakrilamid jel elektroforez (Üre-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi

Elektroforetik analizler için 3.3.7.1.'den yararlanarak suda çözünmeyen ve dipte toplanan kısım alınmış ve dondurarak kurutulmuştur. Dondurularak kurutulmuş örneklerden 10 mg alınarak örnek tamponunda çözündürülüp jellere enjekte edilmiştir. Üre-PAGE (Andrews, 1983) önerdiği ve (Shalabi ve Fox, 1987) tarafından kısmi olarak modifiye edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elektroforez PROTEAN II XI dikey slab-jel ünitesi (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford. UK) kullanılarak yapılmış ve elde edilen jeller Blakesley ve Boezi (1977)'de belirtildiği gibi Coomassie Brilliant Blue G250 ile direkt boyanmıştır. Boya giderildikten sonra elde edilen jeller bir Scanner (HP Scanjet Software, Scanjet G4010. Hewlett Packard. Palo Alto, CA) kullanılarak taranmıştır. Kazein fraksiyonları ile bu bantların yoğunluğu kullanılan Image Master TotalLab Phoretix 1D Pro software (Keel House, Newcastle upon Tyne, UK) yazılım ile belirlenmiştir. Kazein fraksiyonları ile bunların ilgili fragmentlerin ve standart olarak kullanılan Na-kazinat bantların yeri, (McSweeney vd., 1994) tarafından belirtildiği şekilde saptanmış ve bu bantlar dansitometrik integrasyonlar kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir (Hayaloglu, 2003).

Jelin hazırlanışı ve elektroforezin uygulanması aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

a) Stok çözeltilerin hazırlanması

Akrilamid çözeltisi:

Saf suda %40 (w/v) konsantrasyonunda hazır olarak (Merck, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır.

Stacking jel tamponu:

4.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 150 g üre, 2.2 mL konsantre HCl saf suda çözülmüş ve 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı HCl ile 8.9'a ayarlanmıştır.

Separating jel tamponu:

32.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 192.85 g üre, 2.86 mL konsantre HCl saf suda çözülmüş ve 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı HCl ile 8.9'a ayarlanmıştır.

Elektrot tamponu:

15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 73 g glycine saf suda çözülmüş ve 5 L'ye tamamlanmıştır.

Örnek tamponu:

0.75 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 49 g üre, 0.4 mL konsantre HCl, 0.7 mL 2-mercaptoethanol, 0.15 g bromophenol blue saf suda çözülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Amonyum persulfat:

Saf suda %10 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış, 1'er mL eppendorf tüplerine konulmuştur ve daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'nin de saklanmıştır.

Boyama çözeltisi:

Coomassie Brilliant Blue G250 %0.2 (w/v) konsantrasyonda hazırlanmış ve eşit hacimde 1 M H₂SO₄ ile karıştırıldıktan sonra bir gece bekletilmiştir. Ardından çözelti Whatman No. 1 filtre kağıdından süzölmüş ve 9:1 oranında 10 M KOH ile karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiye %12 oranında trikloroasetik asit ilave edilmiştir.

b) Jel çözeltilerinin hazırlanması

Stacking jel çözeltisi:

5 mL akrilamid çözeltisi, 45 mL stacking jel tamponu, 0.1 g N,N,N',N'-metilen bisakrilamid karıştırılmış ve Whatman No. 113 filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen filtrata, 25 µL N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED) ilave edilmiştir.

Separating jel çözeltisi:

22.5 ml acrylamide çözeltisi, 52.5 ml separating jel tamponu 0.375 g N.N.N'.N'-methylene bisacrylamide karıştırılmış ve Whatman No. 113 filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen filtrata, 37.5 µl N.N.N'.N'-tetramethylethylene diamine (TEMED) ilave edilmiştir.

c) Örneğin hazırlanması

Dondurularak kurutulmuş örnekten 10 mg alınarak 1 mL örnek tamponunda çözölmüştür.

d) Elektroforezin uygulanması

Elektroforez ünitesi, üretici firmanın (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK) önerdiği biçimde kurulmuştur. Elektroforeze başlamadan hemen önce başlangıç polimerizasyonunu sağlamak için, separating jel çözeltisine 282 µL amonyum persülfat ilave edilmiştir. Stacking jel çözeltisi, her iki jel ünitesine dökölmüş ve jel seviyesi, jel tarakları yerleştirildiğinde tarakların uç kısmından yaklaşık 1 cm aşağıda olacak şekilde ayarlanmıştır. Jelin üzerine saf su ilave edilmiş ve jel tamamıyla polimerize oluncaya kadar bekletilmiştir (yaklaşık 45 dk). Daha sonra üst kısımdaki su dikkatli bir şekilde dökölmüştür. Stacking jel çözeltisine 300 µL amonyum persülfat ilave edildikten sonra jel ünitesine dökölmüş ve taraklar uygun pozisyonda yerleştirilmiştir. Çözelti polimerize olması için yeterli süre beklenilmiştir (polimerizasyon görölünceye kadar, yaklaşık 45-60 dk). Polimerizasyondan sonra, taraklar çıkarılmış ve jeller içinde yeterli miktarda elektrot tamponu bulunan jel ünitesine yerleştirilmiştir. Elektroforez sistemi soğuk su ile sirköle edilerek soğutulmuştur. Jellere 30 dk süre ile 280 V elektrik akımı uygulandıktan sonra, Na-kazeinat (standart) ve peynir örneklerinin suda çözönmeyen ekstraktları özel şırınga ile jel kuyucuklarına enjekte edilmiştir. Örnekler, önce stacking jel tamponu boyunca 280 V'de, separating jel tamponu boyunca 300 V'de yürütölmüştür. Örneklerin jelde yürütölməsi, boya izinin jel ünitesinin dip kısmına gelinceye kadar devam etmiştir.

e) Jelin boyanması

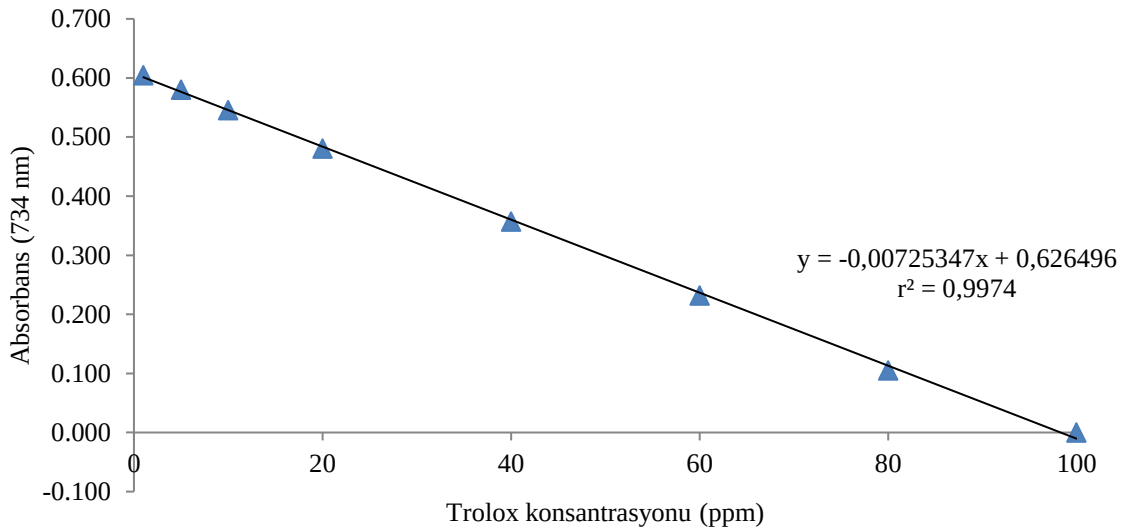
Elde edilen jeller, Blakesley ve Boezi (1977)'nin önerilerine göre hazırlanan jel boyama çözeltisine daldırılmış ve burada bir gece bekletilmiştir. Bu sürede jelde bulunan proteinlerin yoğunluklarına göre boya ile kompleks oluşturmaları sağlanmıştır. Ardından, jeller saf suya daldırılarak bant dışında kalan kısımlardaki boyanın giderilmesi sağlanmıştır.

3.3.12. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi

Antioksidan aktivite tayini, farklı radikalleri bağlama özelliklerine göre 2 farklı metotla gerçekleştirilmiştir.

3.3.12.1. 2,2 -Azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{*+}))

Analizden önce 2.45 mM potasyum persulfat (son konsantasyon 10mL) kullanmak suretiyle 7 mM ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti karanlık ortamda 16 saat bekletilmiştir. ABTS 16 saatlik süre sonunda, etil alkol kullanılarak 734 nm'deki absorbansı 0.70 ± 0.02 olacak şekilde seyreltilmiştir. Epandorf tüplerine 0.1 g peynir örneği tartılıp, üzerine 0,9 mL etanol eklenip Hettich 320R santrifüj ile $13\,500\,g \times 10\,dk$ $4 \pm 1\,^{\circ}C$ 'de santrifüj edilmiştir. Hazırlanan peynir ekstraktından absorbans ölçümü için 100 μ L alınmıştır. Ekstrakt üzerine 2.4 mL ayarlı ABTS^{*+} çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırılmıştır. Vortekste karıştırıldıktan sonra 10 dk karanlıkta bekletilmiş, süre sonunda, etil alkole karşı UV- spektrofotometrede (Shimadzu. UV-1800. Japan) 734 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur.

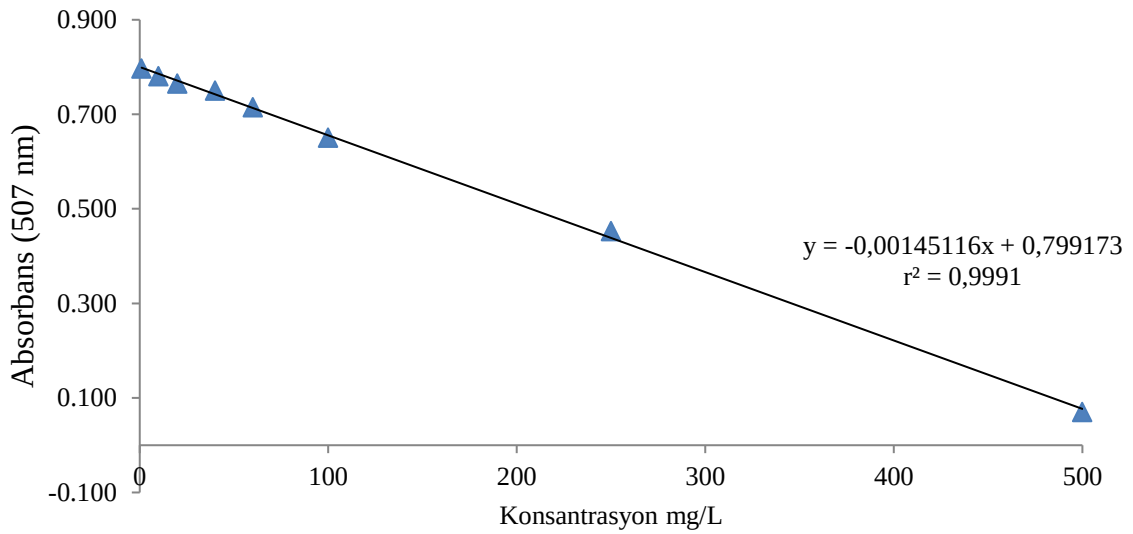


Şekil 3-7 Farklı konsantrasyonlarda Trolox standardının absorbans değerleri (734nm) kalibrasyon eğrisi

Şekil 3.7'de verilen 0.5 ile 100 ppm konsantrasyon aralığında hazırlanan 6-hydroxy-2,5,7,8 Tetramethyl Chroman 2-carboxylic acid (Trolox) standardı 734 nm'de okunan absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinden faydalanılmıştır. Sonuçlar mg Trolox/L örnek cinsinden ifade edilmiştir (Xu vd., 2010).

3.3.12.2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*)

Analizde kullanılan DPPH çözeltisi; 100 mL metanolde 2.5 mg DPPH çözülerek hazırlanmıştır. Ependorf tüplerine 0.2 g peynir örneği tartılıp, üzerine 0,8 mL metanol eklenip Hettich 320R santrifüj ile $13\,500\,g \times 10\,dk$ $4 \pm 1\,^{\circ}C$ 'de santrifüj edilmiştir. Hazırlanan peynir ekstraktından absorbans ölçümü için 100 μ L alınmıştır. Ekstrakt üzerine 3.9 mL ayarlı DPPH* çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 45 dk süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda, metanole karşı UV-spektrofotometrede (Shimadzu. UV-1800. Japan) 517 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur.



Şekil 3-8 Farklı konsantrasyonlarda Trolox standardının absorbans değerleri (517nm) kalibrasyon eğrisi

Şekil 3.8'de verilen 1 ile 500 ppm konsantrasyon aralığında hazırlanan 6-hidroksi-2,5,7,8 Tetramethyl Chroman 2-carboxylic acid (Trolox) standardından 100 μ L alınarak 3.9 mL DPPH çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 45 dk süreyle karanlıkta bekletildikten sonra 517 nm'de okunan absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinden faydalanılmıştır. Sonuçlar mg Trolox/L örnek cinsinden ifade edilmiştir (Lucena vd., 2010).

3.3.13. ACE-Inhibitör aktivitesinin belirlenmesi

Dondurarak kurutulmuş suda çözünür ekstraktların ACE-inhibitör aktivitesi Shimadzu LC 20 AD Prominence HPLC (Shimadzu Corporation. Kyoto. Japan) kullanılarak RP-HPLC ile belirlenmiştir (Reynetha vd., 2013; Jue-Liang vd., 2013). Metod, temelde Hippuryl-histidyl-leucine'in (HHL. Sigma-Aldrich) ACE tarafından hidrolizi sonucu oluşan hippurik asidin miktarını belirlemeye dayalıdır.

Deney karışımı 250 µL çözelti (5 mmol HHL, 0.01 mol/L sodyum fosfat tamponu, 400 mmol/L NaCl, pH: 8.9) ile 25 µL örnek çözeltisi (1 mL sodyum fosfat tamponu 15 mg dondurarak kurutulmuş suda çözünen ekstrakt) karıştırılarak hazırlanmıştır. Takiben 37 °C sıcaklıkta 5 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 200 mUN ACE (tavşan akciğeri ekstraktı, Sigma-Aldrich, Germany) ilave edilip 37 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 25 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için 1 M 25 µL HCl ilave edilmiştir.

İnhibisyon oranı (%) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$ACE - inhibisyon \text{ oranı} = \frac{(A - B)}{B} \times 100$$

A: ACE ve HHL varlığında ve ACE – inhibitör yokluğundaki absorbens

B: ACE, HHL ve ACE – inhibitörü varlığındaki absorbens

3.3.14. Enzim aktivitesi

3.3.14.1. Enzim aktivitesi için peynir ekstraktının hazırlanması

Peynirlerin olgunlaşma süresince peynir ekstraktlarında PePN enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 20 g peynir örneği stomacher poşetinin içine tartılıp ve üzerine 40 mL 0.05 M Tris-HCl tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 5 dk süre ile stomacher cihazında (Stomacher® 400 Circulator London, England) homojenize edilmiştir. Ardından karışımdan 10 mL alınıp, 10.000 × g’de 4°C’de 10 d süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra yağ tabakası uzaklaştırılarak 1 mL alınıp 13.000 × g’de 5 dk süre ile yeniden santrifüj edilmiştir (Kilcawley vd., 2012; Yarlagadda vd., 2014). Elde edilen süpernatantlarda enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır.

3.3.14.2. Peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktivelerinin ölçümü

Olgunlaşma süresince peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktivelerinin ölçümünde Castro ve Martin-Hernandez (1994) tarafından verilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla genel amino peptidaz aktivitesi (PepN) için Leu-p-nitroanilid substratı kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı için 1 mL peynir ekstratından alınıp, üzerine 0.05 mL 16.4 mM substrat ile 1 mL potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) ilave edilmiştir. Karışım 37°C’ de 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1 mL %30’luk asetik asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra karışım 10.000 ×

g'de 10 dk santrijüj edilip reaksiyon sonucunda süpernatanta ürün olarak meydana gelen *p*-nitroanilid konsantrasyonunun 410 nm'deki absorbands ölçümü yapılmıştır.

Enzim aktivitesi *p*-nitroanilid'e ait ekstiksiyon katsayısı kullanılarak $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Niven vd., 1995) belirlenip sonuçlar 1 saatte 1 mL peynir ekstratında serbest kalan nitroanilidin nanomol olarak verilmiştir. 2 tekrarlı olarak ölçüm yapılmış, içerisinde peynir ekstratı bulunmayan numune kör numune olarak kabul edilmiştir.

3.3.15. Renk analizi

Renk değerleri (L^* , a^* , b^*) Konica Minolta-Chroma Meter CR-5 cihazı kullanılarak ölçüm değerleri alınmıştır.

L^* : Aydınlık (0–100)

a^* : Kırmızılık – yeşillik (pozitif değer kırmızılık – negatif değer yeşillik)

b^* : Sarılık – mavilik (pozitif değer sarılık – negatif değer mavilik) ifade etmektedir.

3.3.16. Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için steril kaplara peynir örneklerinden steril şartlarda 10 g tartılmış ve bu örnekler steril Stomacher torbalarının içerisine aktararak üzerine 90 mL (%2'lik) steril sodyum sitrat tamponu ilave edilmiştir. Örnekler stomacher cihazında 1 dk. homojenize edilip 10^{-1} 'lik dilüsyonu hazırlanmıştır. Dilüsyonlar 1 mL $\frac{1}{4}$ ringer çözeltisi içeren tüplerde hazırlanıp, işleme 10^{-6} 'lık dilüsyona ulaşıncaya kadar devam edilmiştir. Peynir örneklerinde maya ve küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri kullanılmıştır. Peynir örneklerinin uygun dilüsyonlarından PDA besiyerine dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan plaklar 25°C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakılıp inkübasyondan sonra koloniler sayılarak maya ve küf sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.3.17. GC-MS ile uçucu bileşiklerin belirlenmesi

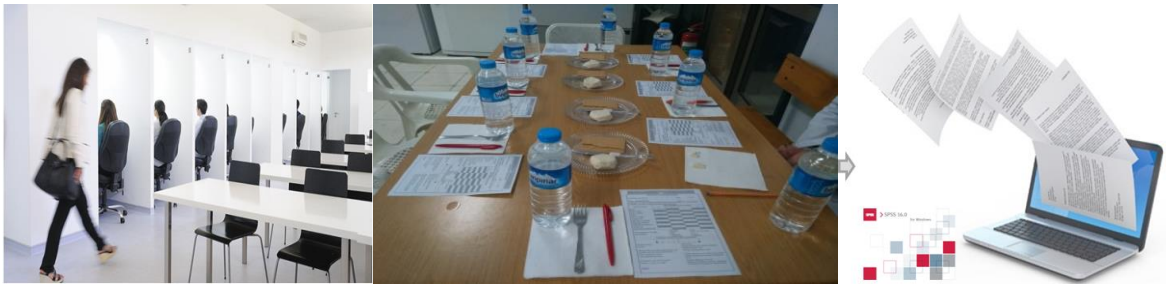
Uçucu bileşiklerin belirlenmesi SPME-GC/MS tekniğine göre yapılmıştır (Pawliszyn, 1997). Bu amaçla -20°C 'de dondurulmuş peynirler rendelenip 3.0 g örnek 15 mL hacimli aroma viallerine tartılmıştır. Asitler için 2-metil-pentanoik asit (300 ppm), esterler için etil heptanoat (300 ppm) ve asit ile ester dışında diğer uçucu bileşikler için 2-metil-3- heptanon (100 ppm) iç standart olarak (10 μL) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 2 cm 50/30 μm divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) fiber-vial enjeksiyonu ile yapılmıştır. Uçucu maddelerin ekstraksiyonunda

çözücüsüz teknik kullanılmıştır. Fiber 40 °C’de 30 dk tepe boşluğunda (headspace) tutularak uçucu bileşiklerin fiber yapısına geçmesi sağlanmıştır. Ekstrakte edilen uçucu bileşiklerin desorpsiyonu için fiber, enjeksiyon bloğuna daldırılarak 250 °C ’de 2 dk bekletilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Bileşiklerin ayırımında DB-Wax (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, ABD) kolonu kullanılmıştır. Uygulanan fırın sıcaklık programı şöyledir: Başlangıçta 40 °C’de 2 dakika tutulmuş (desorpsiyon periyodu) ve dakikada 5 °C olmak üzere sıcaklık 70 °C’ye yükseltilerek bu sıcaklıkta 1 dk tutulmuştur. Daha sonra sıcaklık dakikada 10 °C artışla 240 °C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 30 dk tutulmuştur. Kütle spektrometresi 33-450 atomik kütle birimi arası ayarlanmış (eşik değeri 1000) ve örnekleme hızı dakikada 1.11 tarama olarak ayarlanmıştır. Peynirlerin uçucu bileşiklerinin belirlenmesinde Shimadzu QP-2010 kütle spektrometresinin bağlı olduğu Shimadzu GC-2010 gaz kromatografisi sistemi kullanılmıştır.

Ayırımı gerçekleştiren uçucu bileşiklerin tanımlanmasında C₇-C₃₀ alkan serilerinin relative tutunma indekslerinin karşılaştırılması (RRI metodu), Wiley, 45 National Institute of Standards and Technology (NIST) kütüphaneleri ve her bir pikin alıkonma zamanları ile hidrokarbon standardının alıkonma zamanları kullanılarak hesaplanan ‘Retention Index’ (RI) değerleri referans alınmıştır. Sonuçlar µg/100 g peynir olarak verilmiştir.

3.3.18. Duyusal analizler

Peynir örneklerinin duyusal analizleri 7 kişilik panelist tarafından Meilgaard vd. (1999) tarafından önerilen modele göre puanlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için panelistlere cam tabaklarda sunulan peynir örneğinin yanında diyet krakeri ve su verilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3-9 Duyusal analiz uygulama

DUYUSAL PUANLAMA TESTİ				
Panelistin Adı-Soyadı :		Tarih: ,.../... / 201.,		
Ürün : Peynir Üretim /Gün: -		Saat : ..., : ...,		
Açıklama: Aşağıda verilmiş olan kalite kriterleri açısından size verilen kodlu örnekleri ayrı ayrı 9 puan üzerinden değerlendiriniz.				
Kalite kriterleri	Örnek Kodları			
	A	B	C	D
Renk ¹				
Kesit Yüzey ²				
Yapı- Tekstür ³				
Koku ⁴				
Lezzet ⁵				
Yabancı Tat ⁶				
Süt Tadı ve Kokusu ⁶				
Olgunluk durumu ⁶				
Tuzluluk Durumu ⁶				
Genel Kabuledilebilirlik				
Puan değerleri ile ilgili açıklamalar Puanlama kriterleri ile ilgili açıklamalar: 1 ● 5 9 ● İstenmeyen Renk¹ Pütürlü² Pütürlü³ Bozuk, İstenmeyen Koku⁴ Ağızda yerken veya çatal-bıçakla alırken çok yumuşak veya çok sert kıvamda olması⁵ İstenilmeyen Aşırı Kötü Seviyede⁶ Parlak Beyaz¹ Düzgün, Parlak² Hava Kabarcık Dağılımı Düzgün Homojen Yapı³ Damak tadına göre arzu edilen peynir kokusu⁴ Tüketici olarak beyaz peynirde istenilen kıvam⁵ İstenilen Mükemmel Seviyede⁶				
Not:				

Şekil 3-10 Duyusal değerlendirme formu

Olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde duyusal değerlendirme yapılarak ve panelistlere Şekil 3.10'da verilen duyusal değerlendirme formu sunulmuştur. Formda, sayısal değerlendirmeyi, panelistlerin örnekleri beğenilerine göre puanlamaları istenmiştir. Örnekler 3 haneli rakamlarla rastgele kodlanmış ve her depolama zamanı için farklı kodlar kullanılmıştır.

3.3.19. İstatistiksel analizler

Sonuçların istatistiksel değeriendirilmesi “SPSS 16.0 for Windows” paket programı ile yapılmıştır. Peynir örnekleri arasındaki değişimler, “one way-ANOVA (analysis of variances)” Duncan’ın çoklu karşılaştırma testi ile $P<0.05$ önem düzeyinde belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu bölümde, bulamaç oranı %0, 1, 3 ve 5, tuz oranı % 1, 2 ve 3 ve olgunlaşma sıcaklığı 5 °C, 10 °C ve 15 °C olmak üzere toplamda üretimi gerçekleştirilen 36 adet deneme model peynirinin 30 günlük depolama süresi sonucu yapılan bileşim ve kimyasal analizleri değerlendirilmiştir. Değerlendirilen bu analiz sonuçları ışığında küflü peynir bulamacının içerdiği *P. roqueforti* kaynaklı hücre dışı proteinazların proteolitik aktivitesinin model peynir üretiminde etkisini incelemek amacıyla üretimi gerçekleştirilen ana üretim model peynirlerimizin 1, 15, 30, ve 60. olgunlaşma günlerindeki fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve duyuşsal değerleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular örnekler arasında ve diğer çalışmalarla karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve tartışılmıştır.

4.1. Deneme model peynirleri analiz sonuçları

Deneme model peynir örneklerinin 30 günlük olgunlaşma sonundaki bileşimsel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Genel olarak baktığımızda ortalama kuru madde %49.56 $\pm$ 2.13, protein %18.81 $\pm$ 0.80, yağ %26.61 $\pm$ 1.30, pH 5.82 $\pm$ 0.39, % laktik asit % 0.44 $\pm$ 0.26 ve suda çözünür azot 0.30 $\pm$ 0.10 bulunmuştur. Ayrıca üretim değişkenlerine göre deneme model peynir örneklerinin pH, laktik asit ve WSN sonuçlarının 3D grafikleri sırasıyla Şekil 4.1. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te verilmiş ve Çizelge 4.2’de ise depolama sıcaklığı, bulamaç konsantrasyonu ve tuz oranlarının ile bu değişkenlerin etkileşimlerine ilişkin varyans analiz sonuçları verilmiştir. Örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerleriyüksek depolama sıcaklığına, düşük tuz oranına ve ilave bulamaç konsantrasyonuna bağlı olarak artış gerçekleşmiştir. Her bir değişkenin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Suda çözünen azot oranının olgunlaşma süresi ilerledikçe artmasında, düşük tuz oranı ve yüksek olgunlaşma sıcaklığının etkisinin olduğu değerlendirilmektedir. Tuz oranı ve depolama sıcaklık değerleri aynı olan örneklere ilave edilen küflü peynir bulamaç konsantrasyonu olgunlaşma indeksine önemli miktarda katkı sağlamıştır ($P<0.01$).

Model peynir üretimimde farklı laktik asit bakterilerinin kullanımı üzerine yapılan çalışmada daha düşük pH ve titrasyon asitliği değerleri elde edilmiştir (Sahingil vd., 2019). Titrasyon

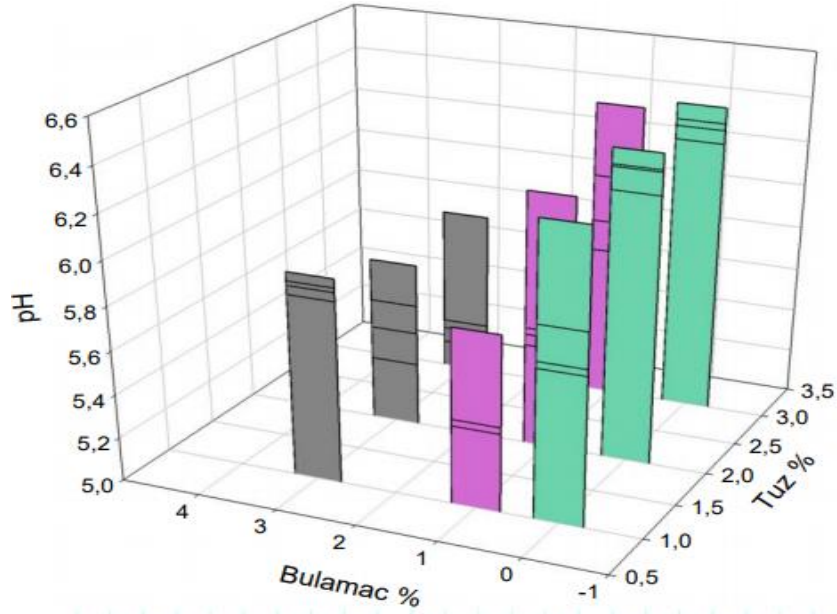
asitliği değerindeki artış ve pH değerindeki düşme, laktik asit bakterileri tarafından laktoz fermentasyonu ile başta laktik asit olmak üzere organik asitlerin üretiminden kaynaklandığı belirtilmektedir (Göncü ve AlpKent, 2005). Model peynir örneklerinin 30 günlük proteolizindeki belirgin artış küflü peynir bulamacı *P. roqueforti* enzimlerinin etkisini yansıtmaktadır (Zarmpoutis vd., 1996; Mane vd., 2019).

Çizelge 4.1 Deneme model peynirleri 30. günde ki pH ve kimyasal analiz sonuçları

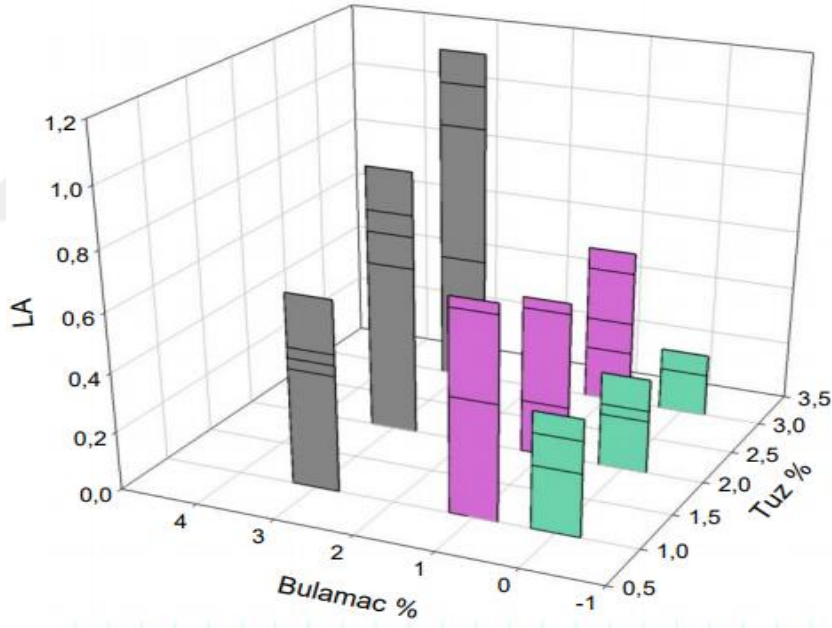
Örnek	Titrasyon Asitliği	pH	Kuru Madde (%)	Kuru Maddede Tuz (%)	Kuru Maddede Yağ (%)	Toplam Protein (TP)	Toplam Azot (TN)	WSN (%)	Olgunlaşma Derecesi
1	0.22±0.01	6.31±0.03	49.28±0.05	2.31±0.06	53.77±1.07	18.71±0.02	2.93±0.00	0.23±0.01	7.82±0.18
2	0.32±0.01	5.87±0.01	50.22±0.41	2.33±0.02	57.75±0.47	19.06±0.16	2.99±0.02	0.23±0.00	7.78±0.13
3	0.40±0.01	5.71±0.02	53.90±0.88	1.74±0.03	48.79±0.50	20.46±0.34	3.21±0.05	0.28±0.03	8.60±0.67
4	0.41±0.02	5.68±0.02	51.40±0.54	1.71±0.02	49.60±1.43	19.51±0.20	3.06±0.03	0.29±0.00	9.36±0.03
5	0.18±0.01	6.40±0.03	46.36±0.35	3.09±0.04	57.16±1.51	17.60±0.13	2.76±0.02	0.21±0.00	7.52±0.09
6	0.22±0.01	6.32±0.03	47.89±0.09	3.30±0.01	53.77±0.42	18.18±0.04	2.85±0.01	0.18±0.02	6.47±0.52
7	0.22±0.01	6.33±0.01	49.23±0.04	3.20±0.01	50.27±0.47	18.69±0.01	2.93±0.00	0.22±0.00	7.40±0.08
8	0.34±0.02	6.22±0.02	46.63±0.09	3.83±0.07	52.01±0.64	17.70±0.03	2.77±0.01	0.26±0.04	9.53±1.30
9	0.16±0.02	6.41±0.03	50.09±0.79	3.68±0.12	53.91±0.85	19.01±0.30	2.98±0.05	0.18±0.00	6.17±0.12
10	0.22±0.01	6.34±0.03	48.33±0.01	4.90±0.06	54.83±1.03	18.35±0.00	2.88±0.00	0.20±0.00	6.80±0.05
11	0.20±0.02	6.31±0.03	48.09±0.13	3.95±0.07	50.94±0.90	18.26±0.05	2.86±0.01	0.19±0.00	6.76±0.17
12	0.23±0.02	6.25±0.01	48.95±0.51	4.06±0.16	52.61±0.04	18.58±0.20	2.91±0.03	0.20±0.00	6.78±0.00
13	0.40±0.01	5.80±0.02	53.85±0.02	2.01±0.06	52.93±0.95	20.44±0.01	3.20±0.00	0.25±0.02	7.77±0.49
14	0.70±0.02	5.36±0.02	50.29±0.08	2.50±0.06	56.67±1.09	19.09±0.03	2.99±0.01	0.35±0.01	11.67±0.36
15	0.70±0.02	5.39±0.03	48.70±0.69	2.10±0.03	52.37±0.75	18.49±0.26	2.90±0.04	0.33±0.01	11.42±0.44
16	0.70±0.02	5.39±0.02	46.90±0.39	2.31±0.08	57.05±1.01	17.80±0.15	2.79±0.02	0.36±0.00	13.05±0.11
17	0.18±0.02	6.17±0.01	50.42±0.55	2.38±0.03	50.59±1.55	19.14±0.21	3.00±0.03	0.22±0.00	7.43±0.05
18	0.50±0.01	5.47±0.02	49.77±0.75	3.59±0.00	52.77±2.30	18.89±0.28	2.96±0.04	0.32±0.01	10.87±0.12

Çizelge 4.1 (devamı)

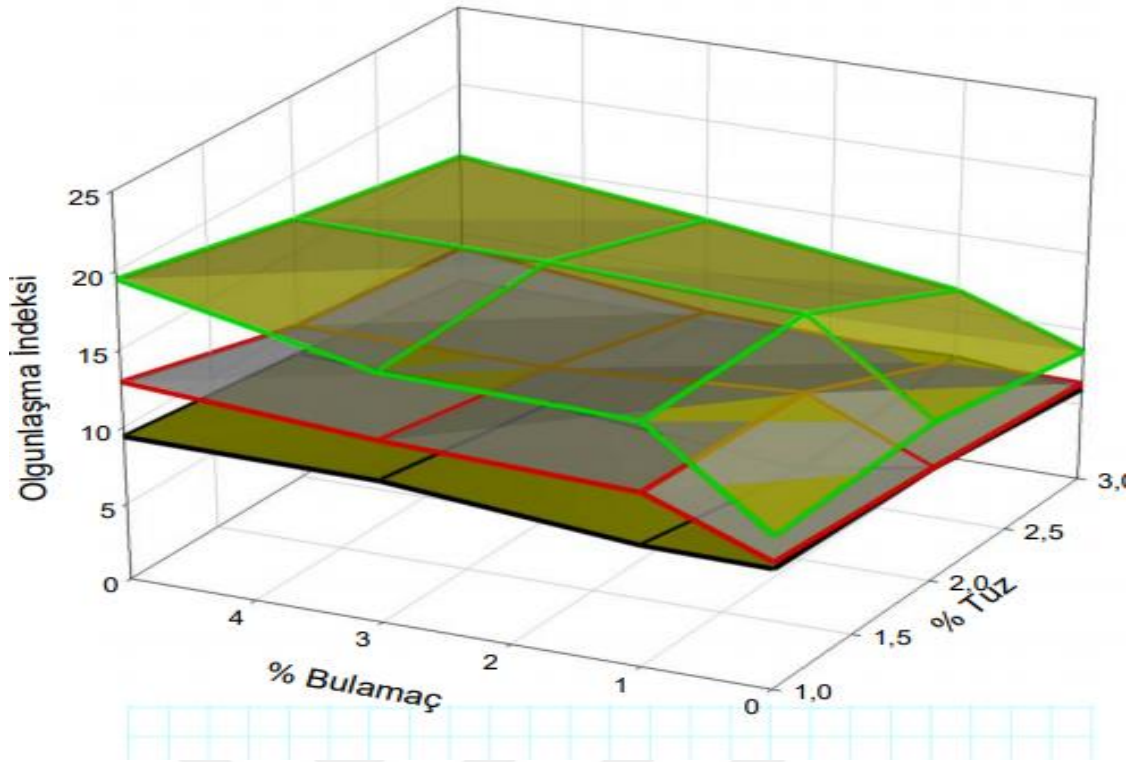
Örnek	Titrasyon Asitliği	pH	Kuru Madde (%)	Kuru Maddede Tuz (%)	Kuru Maddede Yağ (%)	Toplam Protein (TP)	Toplam Azot (TN)	WSN (%)	Olgunlaşma Derecesi
19	0.52±0.02	5.55±0.02	49.98±0.04	3.16±0.11	55.53±0.55	18.97±0.02	2.97±0.00	0.29±0.01	9.72±0.23
20	0.56±0.02	5.52±0.03	48.58±0.37	3.43±0.09	55.07±0.10	18.44±0.14	2.89±0.02	0.30±0.00	10.25±0.11
21	0.20±0.02	6.37±0.03	52.18±0.44	3.36±0.03	53.18±0.03	19.81±0.17	3.1±0.03	0.20±0.02	6.29±0.14
22	0.27±0.02	6.04±0.01	51.52±0.30	3.92±0.08	54.36±1.29	19.56±0.11	3.07±0.02	0.20±0.00	6.58±0.01
23	0.45±0.02	5.83±0.02	51.62±0.12	3.74±0.01	53.28±0.12	19.59±0.05	3.07±0.01	0.23±0.00	7.39±0.12
24	0.54±0.01	5.69±0.02	50.02±0.04	4.09±0.00	53.98±2.04	18.99±0.02	2.98±0.00	0.27±0.00	9.04±0.02
25	0.43±0.04	5.93±0.03	54.18±0.10	2.05±0.00	52.60±0.83	20.57±0.04	3.22±0.01	0.32±0.01	9.86±0.07
26	0.49±0.02	5.87±0.02	47.50±0.09	2.28±0.06	61.57±0.41	18.03±0.03	2.83±0.01	0.45±0.03	15.80±0.01
27	0.45±0.02	5.83±0.01	50.02±0.24	1.75±0.01	53.48±0.25	18.99±0.09	2.98±0.01	0.48±0.02	16.10±0.11
28	0.67±0.02	5.89±0.02	46.79±0.46	2.56±0.04	56.63±0.52	17.76±0.17	2.78±0.03	0.55±0.02	19.66±0.17
29	0.56±0.02	5.57±0.02	52.19±0.16	2.63±0.05	51.74±2.07	19.81±0.06	3.11±0.01	0.33±0.00	10.47±0.03
30	0.76±0.01	5.29±0.03	46.79±0.21	2.56±0.07	53.97±0.29	17.76±0.08	2.78±0.01	0.43±0.02	15.39±0.73
31	0.70±0.02	5.76±0.02	46.66±0.04	4.26±0.13	57.86±0.05	17.71±0.02	2.78±0.00	0.48±0.01	17.11±0.27
32	0.88±0.02	5.44±0.01	48.77±0.63	3.90±0.01	52.81±1.19	18.51±0.24	2.90±0.04	0.5±0.00	17.39±0.25
33	0.41±0.02	5.77±0.02	51.14±0.13	3.89±0.01	52.79±1.82	19.41±0.05	3.04±0.01	0.25±0.01	8.32±0.24
34	0.90±0.02	5.23±0.02	49.45±0.28	4.14±0.02	51.57±0.29	18.77±0.11	2.94±0.02	0.33±0.01	11.20±0.13
35	1.08±0.04	5.19±0.03	49.01±0.16	5.73±0.10	52.03±0.17	18.61±0.06	2.92±0.01	0.39±0.01	13.44±0.01
36	1.13±0.02	5.12±0.02	47.60±0.46	5.90±0.18	54.10±1.05	18.07±0.17	2.83±0.03	0.43±0.03	15.03±0.18



Şekil 4-1 Deneme model peynirleri pH 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)



Şekil 4-2 Deneme model peynirleri %LA 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)



Şekil 4-3 Deneme model peynirleri WSN 3D grafiği (●5 °C. ●10 °C ve ●15 °C)

Çizelge 4.2 Deneme model peynirleri varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	WSN/TN		pH		%LA	
	F	P	F	P	F	P
Tuz (T)	738.529	0.000	1.496.083	0.000	18.103	0.000
Bulamaç Oranı (B)	768.094	0.000	8.323.222	0.000	1.701.068	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	3.736.193	0.000	36.078.583	0.000	68.450.689	0.000
T*B	22.237	0.000	508.305	0.000	56.448	0.000
T*S	42.503	0.000	11.463.708	0.000	1.325.431	0.000
B*S	177.359	0.000	761.472	0.000	148.931	0.000
T*B*S	19.586	0.000	775.931	0.000	133.155	0.000

4.2. Analiz sonuçları deney dizaynı değerlendirme

Olgunlaşma indeksi bulamaç ilavesi olmayan peynir örneklerinde %6.17 iken, düşük tuz ve yüksek sıcaklık depolama koşulunda %9.86'a ulaşılmıştır. %5 bulamaç ilavesi ile bu değer %19.66 olmuştur. Cevap Yüzey Metodu [Response Surface Methodology (RSM)] kullanılarak deney dizaynında değerlendirilmesi yapılmıştır. Bunun için deneme model

peynir örneklerine ait 30. gün bileşim analiz değerleri ile olgunlaşma indeks verileri Dizayn Expert programı kullanılarak korelasyon hesaplaması gerçekleştirilmiştir. Deneme model peynirlerinin olgunlaşma indeksi Box-Behnken dizaynı kullanılarak edilen formül (Çizelge 4.3) ile deneysel verilere ilişkin hesaplamaların karşılaştırması Çizelge 4.4’de verilmiştir. Box-Behnken dizaynı kullanılarak model peynir üretiminde ve olgunlaşmasında proses değişkenleri (A: bulamaç yüzdesi, B: sıcaklık ve C: tuz yüzdesi) değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3 Cevap yüzey metodu WSN deney dizaynı

$$\% \text{ WSN/TN değeri} =$$

$$11.65034$$

$$+ (0.37247 \times A)$$

$$- (1.47228 \times B)$$

$$+ (1.83360 \times C)$$

$$+ (0.14885 \times A \times B)$$

$$- (0.21075 \times A \times C)$$

$$- (0.048500 \times B \times C)$$

$$- (0.11605 \times (A)^2)$$

$$+ (0.091564 \times (B)^2)$$

$$- (0.56091 \times (C)^2)$$

Çizelge 4.4 Cevap yüzey metodu deney dizaynı ile deneme model peynir örneklerinin % WSN/TN deneysel sonuçların karşılaştırılması

Örnek	WSN		% Sapma	Örnek	WSN		% Sapma
	Deneysel	Dizayn Ex.			Deneysel	Dizayn Ex.	
1	7.82±0.18	7.61	2.64±2.26	19	9.72±0.23	9.81	1.90±1.30
2	7.78±0.13	8.40	7.95±1.81	20	10.25±0.11	10.83	5.69±1.10
3	8.60±0.67	9.28	8.38±8.48	21	6.29±0.14	5.08	19.18±1.82
4	9.36±0.03	9.24	1.29±0.34	22	6.58±0.01	6.19	5.88±0.15
5	7.52±0.09	7.52	0.80±0.65	23	7.39±0.12	7.72	4.57±1.77
6	6.47±0.52	8.10	25.68±10.08	24	9.04±0.02	8.32	7.90±0.02
7	7.40±0.08	8.56	15.71±1.32	25*	9.86±0.07	10.71	8.67±0.79
8	9.53±1.30	8.09	14.01±11.82	26	15.80±0.01	12.99	17.77±0.05
9	6.17±0.12	6.30	2.23±2.01	27	16.10±0.11	16.85	4.66±0.71
10	6.80±0.05	6.67	1.88±0.78	28	19.66±0.17	19.78	0.79±0.64
11	6.76±0.17	6.71	1.88±1.21	29	10.47±0.03	10.14	3.20±0.01
12	6.78±0.00	5.82	14.14±0.03	30	15.39±0.73	12.20	20.60±3.76
13	7.77±0.49	6.87	11.29±5.61	31	17.11±0.27	15.64	8.58±1.43
14	11.67±0.36	8.41	27.91±2.25	32	17.39±0.25	18.15	4.40±1.52
15	11.42±0.44	10.78	5.53±3.64	33	8.32±0.24	8.44	2.47±1.78
16	13.05±0.11	12.22	6.37±0.81	34	11.20±0.13	10.30	8.08±1.08
17	7.43±0.05	6.54	12.00±0.57	35	13.44±0.01	13.31	0.91±0.07
18	10.87±0.12	7.86	27.66±0.79	36	15.03±0.18	15.40	2.46±1.23

28 nolu peynir örneği en yüksek WSN değeri ve %1'den daha düşük korelasyon sapma değerini vermiştir. Bulamaç ilave oranının peynirdeki proteoliz ve biyoaktif peptid oluşumuna oransal katkısının incelenmesi amacıyla farklı orandaki peynir örneklerinin de üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için bulamaç ilavesi %3 olan 27 nolu peynir ile %5 olan 28 nolu peynir örnekleri bir sonraki deneysel aşama için seçilmiştir.

27 ve 28 nolu peynir örneklerinin birbirleri ile olan sonuçlarının kıyaslanmasının yanı sıra bulamaç konsantrasyonu hariç diğer değişken değerleri aynı olan 25 nolu peynir örneği ile kıyaslanması gerekecektir. Bulamaç ilavesinin peynir örneklerindeki yapılacak analiz sonuçlarına etkisinin araştırılması, karşılaştırılması ve yorumlanması amacıyla 25 nolu peynir örneği kontrol örneği olarak belirlenmiştir.

Olgunlaşma sıcaklığının artırılması peynir sektöründe peynirin aroma oluşumunu hızlandırmak için teknolojik olarak basit bir yöntem olsa da tat ve lezzet kusurlarında yol açabilmektedir. Olgunlaştırmayı hızlandırmak için yapılan bir çalışmada depolama sıcaklığı 13-16 °C'ye yükseltilecek Cheddar peynirinde aroma oluşum %50 artış gerçekleşmiştir (El Soda, 2002). 5 °C'lik düşük depolama sıcaklığına rağmen 15 nolu örneğe bulamaç ilavesi sonucu 25 nolu örnek ile 30. gün olgunlaşma dereceleri benzerlik göstermiştir. Benzer WSN değerine ulaşmasının yanında peynir lezzet oluşumu ve diğer analiz parametre verilerinde karşılaştırılması çalışmamızı daha kıymetli kılacaktır. Peynir olgunlaşmasındaki biyokimyasal değişim ile tat ve lezzet üzerine olan etkiyi gözlemlemek amacıyla 15 nolu örneğimizin de üretimi gerçekleştirilmiştir.

Model peynir olarak üretimi için belirlenen 15, 25, 27 ve 28 nolu örneklerin üretimi 2 tekrarlı olarak yapılmış, olgunlaştırma süresi 60 gün olarak belirlenmiş ve 1, 15, 30 ve 60. gün analizleri yapılmıştır.

4.3. Ana üretim analiz sonuçları

4.3.1. Bileşim ve kimyasal analiz sonuçları

Peynir örneklerinin olgunlaşma süresi boyunca yapılan bileşim ve kimyasal analiz değerleri Çizelge 4.5’de verilmiş olup ayrı ayrı değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çizelge 4.5 Peynir örneklerinin kimyasal bileşim sonuçları

	Günler	25	15	27	28
Kuru Madde %	1	48.01±0.29 ab.A	46.97±0.30 a.A	48.57±0.98 b.A	48.18±1.06 ab.A
	15	50.58±1.12 a.BC	47.32±0.52 b.A	48.98±1.49 ab.A	48.86±1.19 ab.AB
	30	52.24±2.23 a.C	49.36±1.03 b.B	50.48±1.59 ab.A	50.99±1.61 ab.AB
	60	49.65±1.64 ab.AB	47.93±0.86 b.A	50.27±2.25 ab.A	51.60±3.11 c.B
Yağ %	1	26.13±0.63 a.A	25.00±0.82 b.A	24.88±0.63 b.A	25.75±0.29 ab.A
	15	25.88±1.03 a.A	25.25±0.96 a.A	25.38±1.11 a.A	25.75±1.05 a.A
	30	26.00±1.41 a.A	25.38±1.03 a.A	26.00±1.47 a.A	25.50±1.73 a.A
	60	26.88±0.85 a.A	25.25±0.96 a.A	26.88±2.78 a.A	27.38±3.35 a.A
Kuru Maddede Yağ %	1	54.41±1.09 a.A	53.22±1.56 a.A	51.22±0.84 b.A	53.47±1.41 a.A
	15	51.14±1.01 a.B	53.35±1.80 a.A	51.80±1.07 a.A	52.68±2.05 a.A
	30	49.77±1.45 a.B	51.39±1.02 a.A	51.48±1.43 a.A	49.97±1.88 a.A
	60	54.14±0.78 a.A	52.67±1.26 a.A	53.37±3.38 a.A	52.90±3.37 a.A
Tuz %	1	1.06±0.03 ab.A	1.10±0.03 b.A	1.03±0.03 a.A	1.04±0.03 a.A
	15	1.07±0.06 a.A	1.08±0.03 a.A	1.14±0.03 a.A	1.14±0.05 a.AB
	30	1.20±0.07 a.B	1.15±0.03 a.B	1.27±0.11 a.B	1.31±0.25 a.B
	60	1.15±0.07 a.AB	1.20±0.03 a.C	1.20±0.07 a.AB	1.20±0.13 a.AB
Kuru Maddede Tuz	1	2.20±0.06 a.A	2.33±0.07 b.A	2.12±0.03 a.A	2.17±0.09 a.A
	15	2.12±0.13 a.A	2.29±0.06 b.A	2.32±0.11 b.AB	2.33±0.12 b.A
	30	2.31±0.23 a.A	2.33±0.07 a.A	2.52±0.30 a.B	2.58±0.57 a.A
	60	2.32±0.21 a.A	2.51±0.08 a.B	2.40±0.23 a.AB	2.35±0.38 a.A
% LA	1	0.18±0.00 a.A	0.19±0.02 a.A	0.25±0.03 b.A	0.30±0.03 c.A
	15	0.56±0.02 a.B	0.35±0.02 b.B	0.83±0.07 c.B	0.91±0.18 c.B
	30	0.60±0.02 a.C	0.71±0.02 b.C	0.88±0.04 c.B	0.92±0.09 c.B
	60	0.58±0.04 a.BC	0.62±0.05 a.D	0.64±0.03 a.C	0.81±0.05 b.B
pH	1	6.44±0.02 a.A	6.48±0.03 a.A	6.23±0.11 b.A	6.22±0.08 b.A
	15	5.61±0.01 a.B	6.10±0.07 b.B	5.25±0.08 c.B	5.19±0.10 c.B
	30	5.37±0.07 a.C	5.36±0.06 a.C	5.83±0.17 b.C	5.65±0.43 ab.C
	60	5.58±0.13 a.B	5.62±0.08 a.D	6.13±0.10 b.A	6.30±0.13 c.A

Çizelge 4.5 (devamı)

	Günler	25	15	27	28
TN	1	2.92±0.07 ^{a,A}	2.94±0.13 ^{a,A}	2.94±0.08 ^{a,A}	2.95±0.06 ^{a,A}
	15	3.10±0.09 ^{a,B}	2.94±0.11 ^{b,A}	3.04±0.04 ^{ab,AB}	3.07±0.06 ^{ab,AB}
	30	3.20±0.09 ^{a,B}	2.99±0.05 ^{b,A}	3.10±0.10 ^{ab,B}	3.08±0.12 ^{ab,AB}
	60	3.08±0.05 ^{ab,B}	2.96±0.10 ^{a,A}	3.01±0.13 ^{ab,AB}	3.15±0.09 ^{b,B}
TP	1	18.62±0.42 ^{a,A}	18.77±0.84 ^{a,A}	18.75±0.52 ^{a,A}	18.84±0.40 ^{a,A}
	15	19.76±0.60 ^{a,B}	18.78±0.73 ^{b,A}	19.39±0.28 ^{ab,AB}	19.56±0.39 ^{ab,AB}
	30	20.38±0.55 ^{a,B}	19.07±0.32 ^{b,A}	19.75±0.62 ^{ab,B}	19.62±0.77 ^{ab,AB}
	60	19.62±0.32 ^{ab,B}	18.86±0.64 ^{a,A}	19.20±0.84 ^{ab,AB}	20.12±0.58 ^{b,A}
WSN/TN	1	6.22±0.52 ^{a,A}	5.37±0.89 ^{A,A}	5.59±0.79 ^{a,A}	5.65±0.92 ^{a,A}
	15	10.69±0.64 ^{a,B}	7.55±1.09 ^{b,B}	12.5±0.33 ^{c,B}	13.12±1.11 ^{c,B}
	30	14.73±1.35 ^{a,C}	16.76±1.29 ^{b,C}	22.51±1.27 ^{c,C}	25.41±1.31 ^{d,C}
	60	21.84±0.59 ^{a,D}	26.44±1.22 ^{b,D}	29.27±0.97 ^{c,D}	31.82±0.90 ^{d,D}
TCA/TN	1	1.29±0.16 ^{a,A}	1.28±0.17 ^{a,A}	1.33±0.16 ^{a,A}	1.44±0.16 ^{a,A}
	15	2.38±0.22 ^{a,B}	1.75±0.24 ^{b,A}	2.71±0.16 ^{c,B}	3.15±0.11 ^{c,B}
	30	3.13±0.16 ^{a,C}	3.21±0.53 ^{a,B}	4.60±0.13 ^{b,C}	5.11±0.16 ^{c,C}
	60	6.09±0.20 ^{a,D}	6.67±0.04 ^{a,C}	9.58±0.81 ^{b,D}	11.53±2.24 ^{c,D}

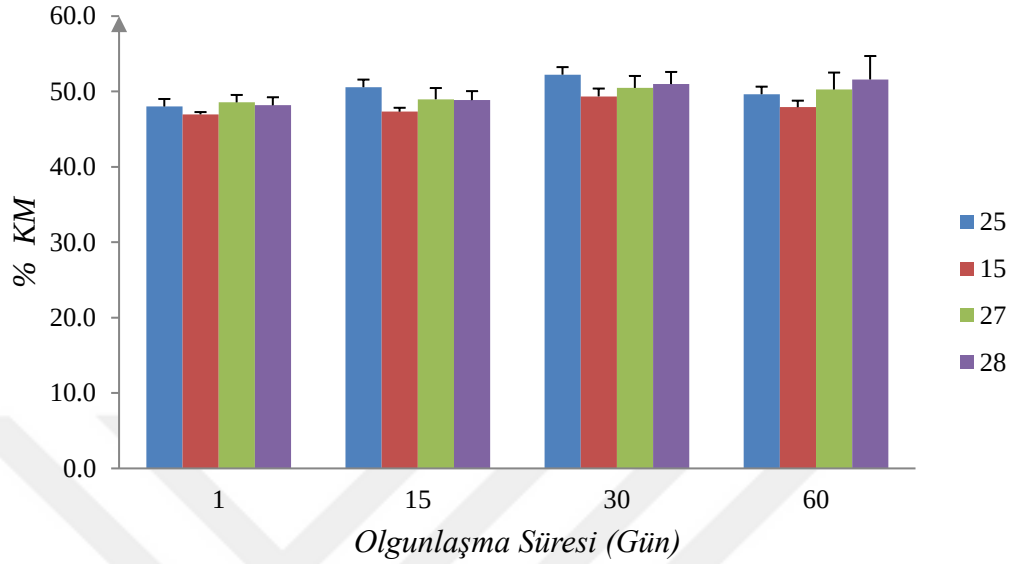
a, b, c, d : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A,B,C,D : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

4.3.1.1. Kuru madde

Peynirlerin toplam kuru madde miktarları Çizelge 4.5’de ve olgunlaşma boyunca değişimi Şekil 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.6’da ise parametrelerin bağımlı değişken olan örneklerin kuru madde oranları üzerine etkilerini gösterir varyans değerleri verilmiştir. Peynirlerin toplam ortalama kuru madde oranları 1. gün % 47.93 ± 0.91 iken 60. gün % 49.86 ± 2.34 bulunmuştur. Olgunlaşma süresince vakum ambalajda depolanan peynir örneklerinden bir miktar su ayrılması meydana gelmiştir (Hayaloglu ve Sahingil, 2016). Depolama boyunca peynir örneklerinin her bölgesinden ayrılan su miktarı farklı olduğundan örneklerin kuru madde miktarlarında farklılık gözlenmiştir. Olgunlaşma sırasında Gouda peynirinin temel parametrelerinin incelendiği bir çalışmada peynirdeki kuru madde miktarı depolama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve peynir kütlesinin derinliğine göre her bölgesinin kuru madde oranlarının birbirinden farklı değerler aldığı belirtilmiştir. (Vandenberghe vd., 2014). Peynir kitlesinden su transferi sıcaklık, bağıl nem, hava akış hızı gibi birçok faktöre bağlıdır (Gaucel vd., 2012). Olgunlaşmaya bağlı olarak örnekler

arasındaki kuru madde değerleri olgunlaşmanın 15. ve 60. günlerinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4-4 Peynir örneklerinin kuru madde oranları (%)

Model peynir örnekleri kuru madde oranları bakımından, yarı sert peynir grubunda değerlendirilebilir. Yapılan bir araştırmada Türkiye’de üretimi yapılan küf ile olgunlaştırılmış 29 adet peynir örneğinin ortalama kuru madde oranının %49.97 olduğu ve peynirleri yarı sert peynir grubuna girdiklerini belirtmişlerdir (Hayaloğlu vd., 2008).

Çizelge 4.6 Peynir örneklerinin kuru madde oranları varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	1.220	0.532	0.591
Depolama Sıcaklığı (S)	22.458	9.803	0.003
Olgunlaşma Süresi (OS)	21.793	9.513	0.000
B*S [†]	-	-	-
B*OS	3.367	1.470	0.209
S*OS	0.506	0.221	0.881
B*S*OS [†]	-	-	-

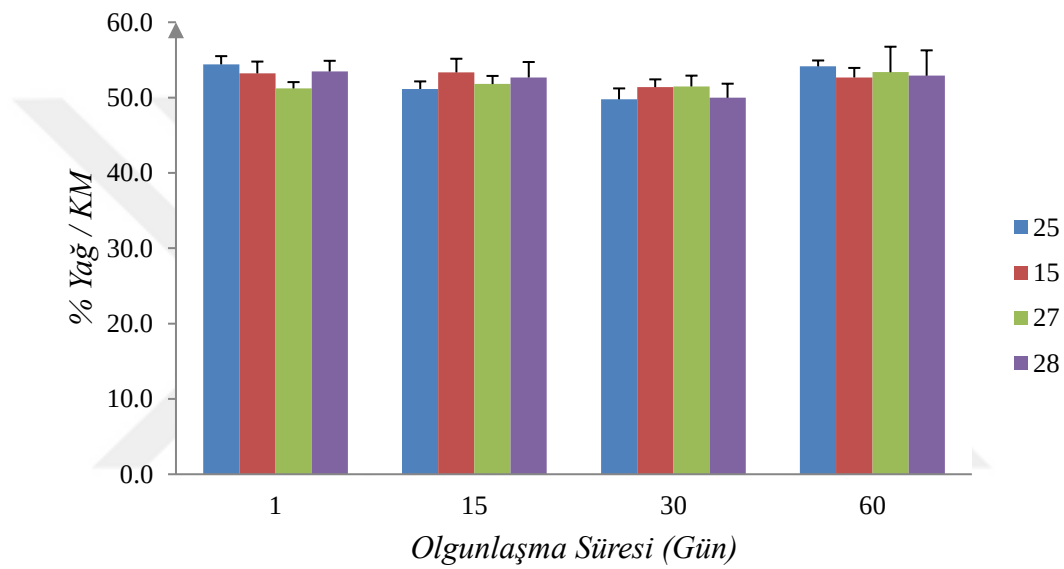
([†]) Sıcaklık değişkeni üç parametreden az olduğundan Post Hoc testi yapılmamıştır.

Çizelge 4.6’da kuru madde oranlarına bulamaç oranının etkili olmadığı, sıcaklık ve olgunlaşma süresinin istatistiksel olarak etkili olduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresince vakum ambalajda depolanan peynir örneklerinde bir miktar su ayrılması olmuştur. Bu su

ayrılması özellikle 15 °C de muhafaza edilen örneklerde daha çok gözlemlenmiştir. Düşük sıcaklıkta peynir kitlesinden su ayrılması diğerlerine göre daha az gerçekleşmiştir. Kuru maddedeki bu değişim diğer besin öğeleri (yağ, kuru maddede yağ, protein, tuz ve nemdeki tuz oranları) üzerinede benzer düzeyde oransal değişikliğe neden olmuştur.

4.3.1.2. Yağ ve kuru maddede yağ

Peynirlerin yağ ve kuru maddede yağ miktarları Çizelge 4.5’de ve olgunlaşma boyunca kuru maddede yağ değişimi Şekil 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.7’de ise kuru maddede yağ oranları üzerine etkilerini gösterir varyans değerleri verilmiştir.



Şekil 4-5 Olgunlaşma süresince belirlenen kuru maddede yağ oranları (%)

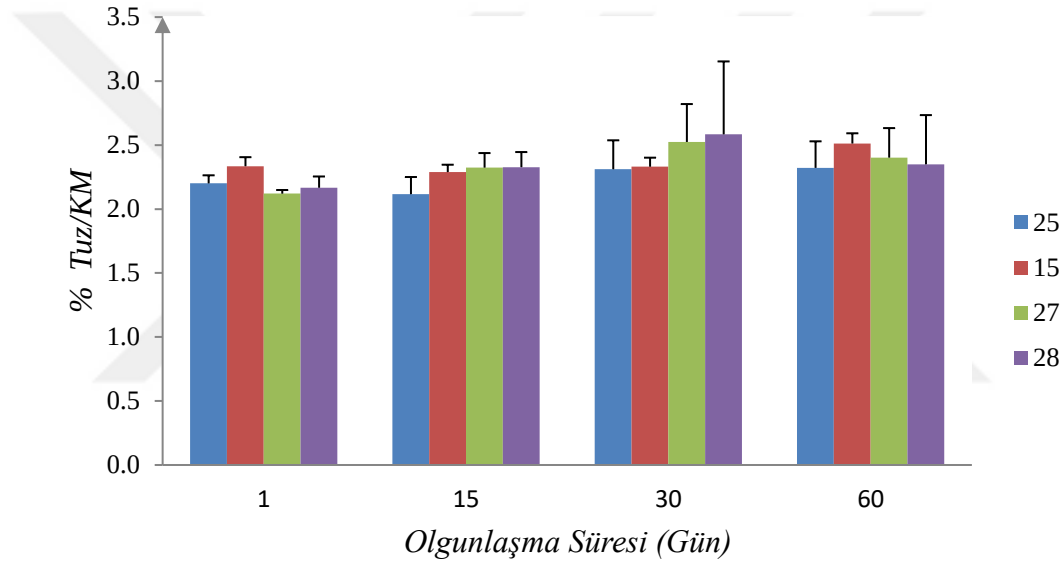
Peynirlerin olgunlaşmanın 1. gününde % yağ oranları %24.9-26.1 ve % kuru maddede yağ oranları %51.2-54.4 arasında olup. Örnekler arasındaki değerlere bulamaç konsantrasyonu ve sıcaklık değişkeninin etkisi olmamıştır. Olgunlaşma periyodu boyunca örnekler arasındaki değişim ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Olgunlaşmanın başlamasıyla peynir çeşitlerindeki yağ değerleri birbirine çok yakın bulunmuştur. Olgunlaşma sıcaklığı ve ilave bulamaç ile peynirlerin yağ değerleri arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Kuru madde değerlerinin olgunlaşma süresine bağlı olarak artışıyla % yağ bileşim oranlarında da artış olmuştur. Kuru maddedeki yağ oranında önemli ölçüde bir değişim olmamış. 60. günde %52.7-54.1 aralığında ölçülmüştür.

Çizelge 4.7 Peynir örneklerinin kuru maddede yağ oranları varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	0.676	0.218	0.805
Depolama Sıcaklığı (S)	3.835	1.237	0.272
Olgunlaşma Süresi (OS)	23.282	7.510	0.000
B*OS	5.849	1.887	0.102
S*OS	3.323	1.072	0.370

4.3.1.3. Tuz ve kuru maddede tuz değerleri

Peynirlerin tuz ve kuru maddede tuz oranları Çizelge 4.5’de ve varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Peynir üretiminde % 1 sabit tuz oranı kullanılmıştır.



Şekil 4-6 Olgunlaşma süresince saptanan kuru maddede tuz oranları (%)

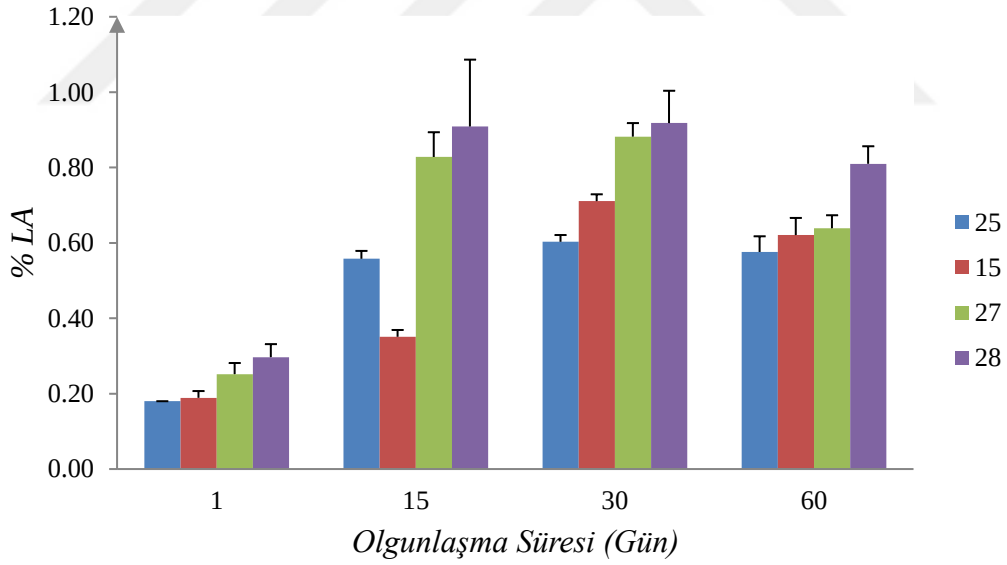
Aynı tuz oranlarında üretimi gerçekleşen peynir örneklerinin depolama boyunca tuz oranlarındaki değişimine sıcaklık ve bulamaç miktarının etkisi bulunmamıştır. Olgunlaşma süresi boyunca kuru madde miktarındaki artışa bağlı olarak kuru maddede tuz oranında artış gerçekleşmiştir. Örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bulunmayan tuz değerleri olgunlaşmanın 1. günü % 1.0-1.1 tuz ve %2.2-2.3 kuru maddede tuz oranı iken 60. gün %1.2 tuz ve %2.3-2.5 kuru maddede tuz olarak ölçülmüştür ($P>0.05$). (Şekil 4.6).

Çizelge 4.8 Peynir örneklerinin kuru maddede tuz oranları varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	0.068	1.384	0.260
Depolama Sıcaklığı (S)	0.005	0.095	0.759
Olgunlaşma Süresi (OS)	0.126	2.576	0.065
B*S	-	-	-
B*OS	0.029	0.584	0.741
S*OS	0.063	1.280	0.292
B*S*OS	-	-	-

4.3.1.4. Titrasyon asitliği ve pH değerleri

Olgunlaşmanın başlangıcında örneklerin titre edilebilir asitliği ortalama % 0.23 ± 0.05 iken, 60. günü % 0.66 ± 0.10 olarak ölçülmüştür. %LA değerleri depolamanın ilk ayında artmış ve en fazla oransal artış 15 gün gerçekleşmiştir. 60. gün ise azalma gösteren titrasyon asitliği değerlerindeki depolama boyunca ölçüm değerleri Çizelge 4.5’de ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4-7 Olgunlaşma süresince saptanan titrasyon asitlik değerleri (% laktik asit)

Çizelge 4.9’daki varyans değerlerine bakıldığında bütün parametrelerin titrasyon asitliği değerleri üzerine etkisi var iken, sadece olgunlaşma süresinin pH değerleri üzerine etkisinin olduğu anlaşılmıştır ($P < 0.05$).

Çizelge 4.9 Peynir örneklerinin titrasyon asitliği ve pH değerleri varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	%LA			pH		
	KO	F	P	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	0.269	77.789	0.000	0.052	2.625	0.083
Depolama Sıcaklığı (S)	0.266	76.887	0.000	0.007	0.367	0.548
Olgunlaşma Süresi (OS)	0.757	218.903	0.000	2.073	105.596	0.000
B*OS	0.019	5.570	0.000	0.334	17.029	0.000
S*OS	0.085	24.730	0.000	0.842	42.873	0.000

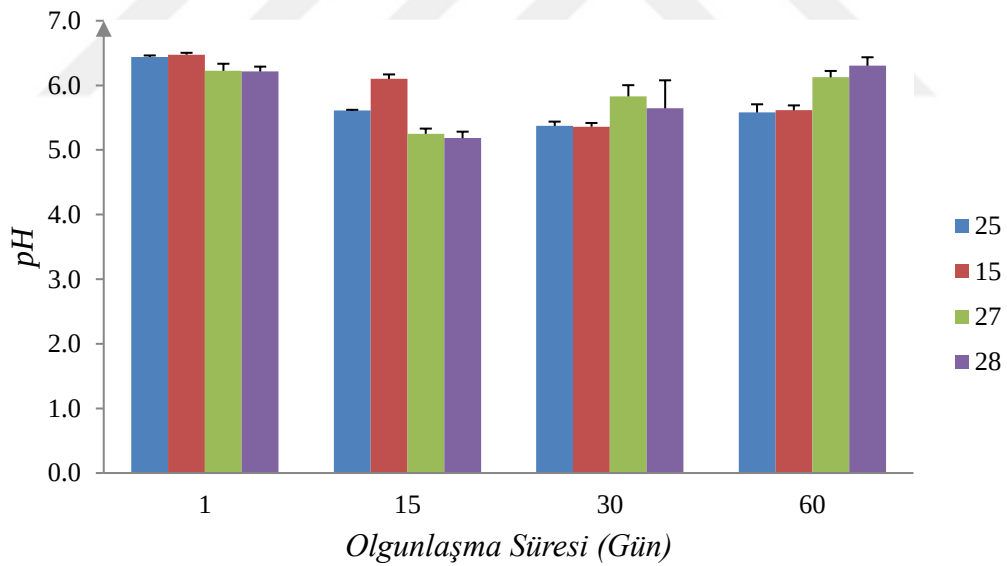
Farklı depolama sıcaklığı ve ilave bulamaç oranları peynirlerin pH değerleri ve olgunlaşma süresindeki değişimleri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Olgunlaşma süresi ve ilave bulamacın peynirlerin pH değerlerinde önemli değişimlere neden olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Depolama sıcaklığının aynı olduğu örneklerde bulamaç ilavesi ile ileri düzeyde olgunlaşmanın gerçekleşmesi neticesinde pH değerlerindeki düşüş daha hızlı gerçekleşmiştir. Olgunlaşmanın 1. gününde 6.22-6.48 olan pH’nın 15. günde 5.19-6.10 arasında olduğu kaydedilmiştir. Düşük depolama sıcaklığından dolayı 15 nolu peynir örneğindeki pH düşüşü diğer örnekler göre yavaş gerçekleşmiştir. Ancak ilave edilen bulamaçtan dolayı 30. gün kontrol örneği ile aynı değerlere ulaşmıştır. Peynirlerin olgunlaşma sıcaklığındaki değişimin pH değerleri üzerine etkili oldukları bilinmektedir (Tiwari vd., 2014).

28 nolu örneğin değerleri Hayaloğlu vd., (2008) tarafından ölçümü gerçekleştirilen 29 farklı küflü peynir örneğine ait ortalama pH değeri 6.29 ve titre edilebilir asitliği % 0.96 olarak ölçülen çalışma sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Küfle olgunlaştırılmış peynirlerin pH’ı, laktik asidin katabolizması ve amino asitlerin küfler tarafından deaminasyonu nedeniyle olgunlaşma sırasında arttığı rapor edilmiştir. Farklı *Lactobacillus* şuşlarının kullanılarak model peynir üretiminin yapıldığı bir çalışmada örneklerin pH değeri depolama boyunca 4.80-5.75 aralığında değişimi gözlemlenmiştir (Sahingil vd., 2019). Çiğ süttten ve pastörize süttten yapılan yarı yumuşak kabuklu peynirlerde *Listeria monocytogenes* gelişiminin depolama sıcaklığı, pH ve su aktivitesi etkileşimi modellenmesi üzerine yapılan bir çalışmada 28 günlük depolama süresi boyunca yüksek saklama sıcaklığının pH değerlerinde artış gerçekleştirdiği, özellikle 4 °C’de depolanan her iki peynir türünün pH’ının, 10 veya 15 °C’de depolananlardan önemli ölçüde ($P<0.05$) daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tiwari vd., 2014). Bununla ilgili olarak *P. roqueforti* kültürü kullanılarak üretimi gerçekleştirilen peynirler üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında İspanyol mavi peynir üretiminde starter

kültür kullanılmadığından pH 6.40-7.63 (Diezhandino vd., 2015) iken, starter kültür ilavesi yapılan Danimarka mavi peynirinde 5.11-5.69 olarak ölçülmüştür (Mane vd., 2019).

Küf kaynaklı peynirlerde laktik asit yıkımı ve amino asitlerin deaminasyonu sebebi ile başka peynir çeşitlerine göre pH yüksek olmaktadır (Hayaloglu ve Kırbağ, 2007). Civil peynirinde küflendirme ile pH 4.45'den 4.65'e (Tekinşen vd., 1996), ve tulum peynirinde küflendirme ile pH 5.36 dan 5.70'e yükselmiştir (Ayar vd., 2006).

Depolama sıcaklık farklılığı olgunlaşmanın 1. ayında etkili olmuştur. Düşük depolama sıcaklığına sahip 15 nolu peynir örneği içerdiği bulamaçtan dolayı 30. gününde kontrol örneği değerinin üzerine çıkmıştır. 15 ve 27 nolu örneklerin 60. gününde % LA değerleri birbirine yakın değerlerdedir. Bulamaç ilavesi peynirlerin göre titrasyon asitliğinin artışına sebep olmuştur. Özellikle %5 bulamaç ilave edilen 28 nolu örnek olgunlaşma süresi boyunca yüksek titrasyon asitliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni örnekler arasındaki proteoliz nedeniyle laktik asidin metabolizması, amino asitlerin deaminasyonu ve NH₃ gibi bazik karakterli parçalanma ürünlerinin peynirin pH'sını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır (Fox vd., 1993; Dağdemir, 2001).



Şekil 4-8 Olgunlaşma süresince saptanan pH değerleri

Peynir örneklerinin pH değerlerinde 15. ve 30. günlerde azalma, olgunlaşmanın ilerlemesi ile artış gözlenmiştir. Özellikle 27 ve 28 nolu peynir örneklerindeki pH'daki düşüşün fazla olması ve daha erken yükselme eğilimi göstermesi, bu peynirlerde olgunlaşma aşamalarının hızlı ilerlediğini göstermiştir. Olgunlaşmanın belirli aşamasından sonra oluşan amonyak, karbonil bileşikler vb. bazik maddeler nedeniyle veya amino asitlerin deaminasyonu ve

organik asitlerin metabolizması sonucu pH'nın yükseldiği de belirtilmektedir (Hayaloglu, 2003). Sıcaklık ve küflü peynir bulamacı, olgunlaşma süresi boyunca örneklerin laktik asit ve pH değerlerinde önemli değişikliklere neden olmuştur ($P<0.05$).

4.3.2. Peynir örneklerinde meydana gelen proteoliz

Proteoliz sırasında antimikrobiyal, antihipertansif, immünomodülatör, analjezik ve antioksidan aktiviteler dahil olmak üzere peynirde insan metabolizmasını olumlu yönde etkileyebilen spesifik biyoaktivitelere sahip peptitlerin oluşumu gerçekleşir (Hartmann ve Meisel, 2007; Gupta vd., 2009). Peynir örneklerinde olgunlaşma süresince meydana gelen proteoliz; peynirlerin azot fraksiyonları, serbest amino asit miktarları, üre-PAGE elektroforetik analizleri ve RP-HPLC peptit profilleri çıkarılarak ayrı ayrı açıklanmış ve tartışılmıştır.

Proteoliz derecesi peynir türlerine göre de değişir. Mozzarella peyniri sınırlı proteolize, Cheddar ve Gouda orta proteolize maruz kalırken, küfle olgunlaşan peynirlerin daha ileri derecede proteolize uğraması beklenir (Clark vd., 2009). Proteoliz derecesi farklılıkları peynir acılık seviyesini de etkilemektedir. Blue peynirleri ileri proteoliz geçirdiğinden, keskin, acı ve küflü lezzet ve keskin kokuya sahiptirler. İlave kültürlerin eklenmesi, proteolizi ve peynirdeki serbest amino asit miktarını artırması beklenir (Andiç vd., 2014).

15, 27 ve 28 nolu model peynir örneklerin proteolizinde gözlemlenen belirgin artış, peynir bulamacından gelen *P. roqueforti*'nin proteolitik etkisinden kaynaklanmıştır (Mane vd., 2019). Örneklerin olgunlaşma dereceleri arasındaki fark, özellikle bulamacın katkı oranına bağlı olarak değişiklik göstermiştir ($P<0.05$). Proteoliz seviyesinin artmasında Konya küflü peynir mikroflorasındaki enzimlerin tipi, miktarı ve aktivitesinin katkı sağladığı söylenebilir. Suda çözünür azot fraksiyonlarının (büyük peptitler) oluşumu süt pıhtılaştırıcı enzimlerden daha fazla etkilenirken, %12'lik TCA'da starter enzimlerin çözünür fraksiyonları (kısa zincirli peptitler, amino asitler, amonyak ve diğer küçük bileşenler) oluşumunda etkili olduğu belirtilmektedir (Hayaloglu, 2003).

4.3.2.1. Azot fraksiyonları

Azot fraksiyonları belirtilirken çoğunlukla % azot üzerinden hesaplanan değerler verilmektedir. Ayrıca, peynirlerin çözünür nitelikli azot fraksiyonları, içerdikleri toplam azot oranlarında da etkilenmektedir. Bu kısımda suda ve %12 Trikloroasetik asitte (TCA) çözünen azot değerleri ile hesaplanan diğer azot fraksiyonları için elde edilen bulgular

tartışılırken, % azot üzerinden hesaplanan değerler dikkate alınmıştır. Bu değerler Çizelge 4.5.'de standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

4.3.2.1.1. Toplam azot oranları

Peynir örneklerinin protein oranları depolama boyunca birbirine yakın değerler olduğundan istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Peynir örneklerinin vakum paketlerde depolandığından toplam protein oranlarında değişim gözlenmemiştir. Proteoliz nedeniyle proteinin çözünen fraksiyonlarında artma meydana gelmiştir. Bazı çalışmalarda toplam protein oranının olgunlaşma süresi içerisinde önemli bir değişikliğe uğramadığını belirtmişlerdir (Hayaloglu, 2003).

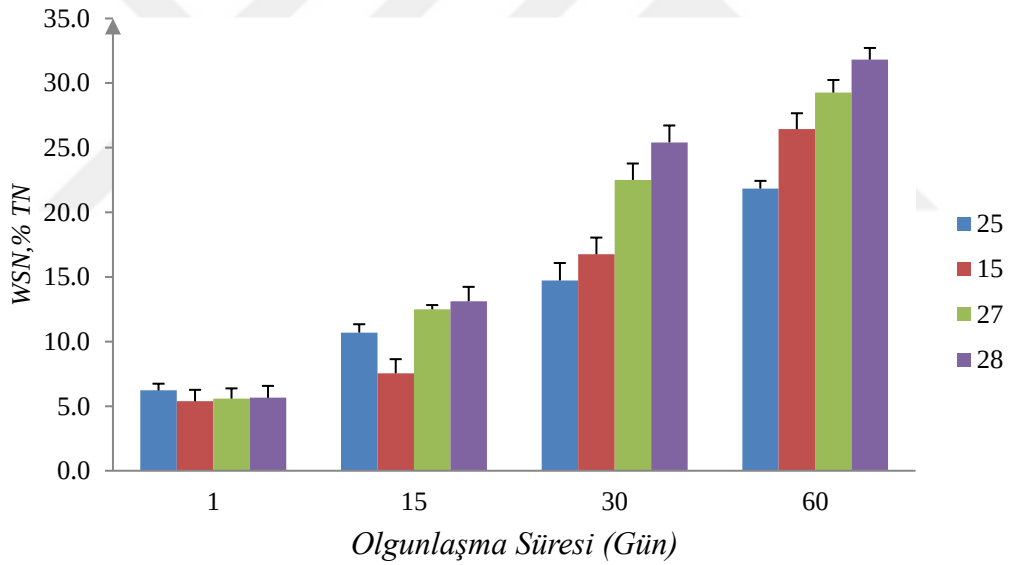
4.3.2.1.2. Suda çözünen azot oranı

Olgunlaşma süresince tüm örneklerde suda çözünen azot oranları artış göstermiştir. Olgunlaşmanın 1. gününde istatistiksel olarak farkı olmayan suda çözünen azot oranları %5.4-6.2 arasında değişen değerler almıştır. Suda çözünen azot oranları depolama boyunca farklılık göstermiş, 15. gün %7.6-13.1, 30. gün %14.7-25.4 ve 60. gün %21.8-31.8 olarak ölçülen değerler arasındaki değişim önemli derecede farklı bulunmuştur ($P<0.05$). Yüksek olgunlaşma sıcaklığı ve özellikle bulamaç ilavesinin olgunlaştırmayı hızlandırması sonucu depolama süresince suda çözünen azot miktarındaki meydana gelen değişim Çizelge 4.5 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca aynı depolama sıcaklığında muhafaza edilen 27 ve 28 nolu örneklerin 30. gün suda çözünen azot oranı 25 nolu kontrol örneğinin 60. gün ölçülen değerinin üzerinde tespit edilmiştir. Bu örneklerdeki değişim olgunlaşmanın daha hızlı gerçekleşmesinden kaynaklanmıştır. Düşük depolama sıcaklığına sahip 15 nolu örneğin suda çözünen azot miktarındaki artış depolamanın ilk ayında yavaş gerçekleşirken, ilave bulamacın etkisiyle ikinci ayında hızlı artış göstermiştir. Çizelge 4.10'da üretim parametreleri ile depolama sıcaklığı ve süresinin suda çözünen azota etkisini gösterir varyans analiz sonuçları verilmiştir. Olgunlaşma süresi, depolama sıcaklığı ve bulamaç ilavesinin suda çözünen azot değerleri üzerinde etkili oldukları saptanmıştır ($P<0.01$).

Çizelge 4.10 Peynir örneklerinin % WSN/TN varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	135.538	136.706	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	94.363	95.176	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	1223.522	1234.064	0.000
B*OS	33.608	33.897	0.000
S*OS	12.270	12.376	0.000

Olgunlaşma süresi boyunca bulamaç ilaveli peynirlerde proteolizin daha hızlı ilerlemesinden dolayı suda çözünen azot oranları kontrol peynirine oranla yüksek değerler aldığı belirlenmiştir.



Şekil 4-9 Olgunlaşma süresince saptanan %WSN/TN değerleri

Gerçekleşen proteoliz nedeni ile kazeinin hidrolizi sonucu meydana gelen peptitlerin, ortamda bulunan enzimler ile suda çözünür formdaki küçük molekül ağırlıklı peptidlere, serbest amino asitlere ve azotlu bileşiklere parçalandığı bildirilmiştir (Öztürk, 2015).

Olgunlaşma derecesinin değişimi azotlu bileşiklerin suda çözünür hale geçmeleriyle doğrudan ilişkilidir (Gürsoy, 2005). Suda çözünen azot miktarındaki artış, olgunlaşma derecesinde de artışa neden olmuştur. Peynirler arasındaki olgunlaşma dereceleri arasındaki

farklılık özellikle bulamacın katkı oranına bağlı olarak değişim göstermiştir. Bu da bulamacı yapılan Konya küflü peyniri mikroflorasından kaynaklanan enzimlerin tipi, miktarı ve aktivitesinden dolayı farklılık göstermiştir (Mane vd., 2019).

4.3.2.1.3. %12 Trikloroasetik asitte çözünen azot oranı

%12 TCA'da çözünen veya bir başka deyişle protein olmayan azot oranları, orta ve kısa zincirli peptitler ile amino asitlerden oluşmaktadır (Hayaloglu, 2003; Öründü ve Tarakçı, 2021).

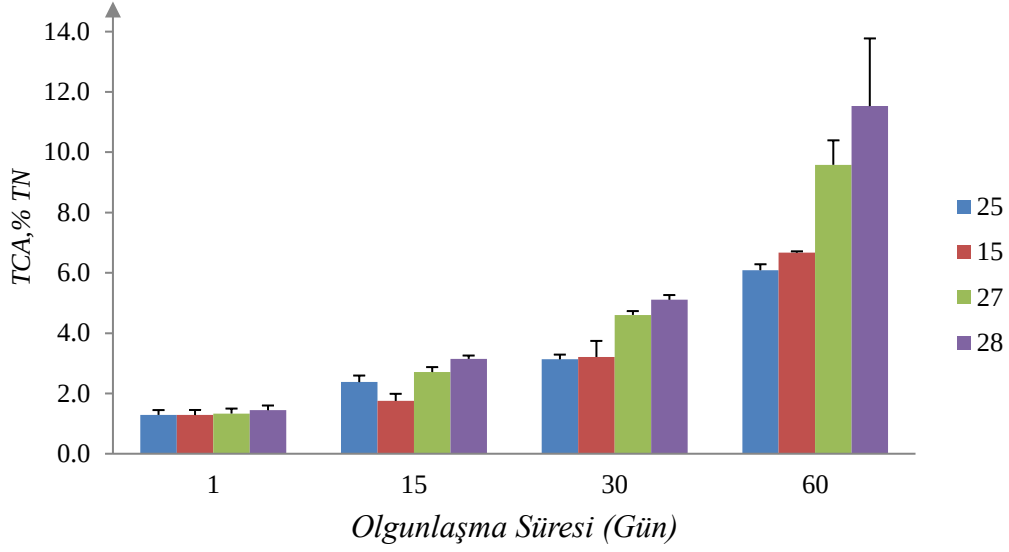
Olgunlaşma başlangıcında %12 TCA'da çözünen azot oranları önemsiz bulunurken %1.3-1.4 arasında saptanmış, 15. gün %1.8-3.2 30. gün %3.1-5.1 ve 60. gün %6.1-11.5 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.10). Olgunlaşmanın 30. gününde düşük olgunlaşma sıcaklığındaki 15 nolu örneğe ilave edilen bulamacın etkisinden dolayı 25 nolu kontrol örneği değerinden fazla %12 TCA'da çözünen azot oranı tespit edilmiştir.

Olgunlaşma süresince olgunlaşma sıcaklığı değeri ile ilave bulamaç oranlarındaki farklılıktan dolayı istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı değerler almışlardır ($P<0.05$). Çizelge 4.11'de, suda çözünen azot değerinde olduğu gibi %12 TCA'da çözünen azot oranına varyasyon kaynaklarının önemli derecede etkisi olmuştur.

Çizelge 4.11 Peynir örneklerinin % TCA/TN varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	17.872	45.223	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	14.121	35.731	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	122.355	309.606	0.000
B*OS	5.803	14.684	0.000
S*OS	2.847	7.204	0.000

Mavi damarlı peynirlerin ayırt edici bir özelliği; laktik asit bakterilerinin, pıhtılaşma enziminin ve esas olarak *Penicillium* spp.nin neden olduğu kapsamlı proteolizdir (Prieto vd., 2000; Cantor vd., 2004). Diğer mavi damarlı peynirlere göre düşük proteoliz derecesi gösteren İtalyan peyniri olan Strachitunt peynirinin 11 adet örneğinin 75 günlük olgunlaşma sonunda ulaştığı ortalama % 9.51 TCA seviyesi ile 27 ve 28 nolu örnekler benzerlik göstermiştir (Masotti vd., 2017).



Şekil 4-10 Olgunlaşma süresince saptanan %TCA/TN değerleri

Bulamaç ilavesinin peynirlerde suda çözünen azot oranlarından daha çok %12 TCA'da çözünen azot değerleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Suda çözünen azot fraksiyonların (büyük peptitler) oluşumunda daha çok süt pıhtılaştırıcı enzimlerin etkileri söz konusu iken %12 TCA'da çözünebilen fraksiyonların (kısa zincirli peptitler, amino asitler, amonyak ve diğer minör bileşenler) oluşumunda starter enzimlerin etkili oldukları belirtilmektedir (Hayaloglu, 2003).

Tel peynirinde farklı starter kültürlerin haşlama öncesi ve sonrası kullanılarak 90 gün olgunlaştırıldığı bir çalışmada haşlama sonrası kültürlerin ilave edildiği peynir örneklerinde ısı uygulamasına maruz kalmayan mikroorganizmaların yüksek proteolitik aktivite göstermelerinden dolayı TCA-SN/TN seviyelerinin önemli yüksek değerlere ulaştığı belirtilmiştir (Öründü ve Tarakçı, 2021).

Bulamaç ilave oranına bağlı olarak %12 TCA'da çözünebilir azot fraksiyonları da artmıştır. Bunun Konya küflü peynirinden gelen proteolitik aktiviteye sahip mikrofloradan kaynaklandığı düşünülmektedir (Hayaloğlu vd., 2008).

Güçlü bir aminopeptidaz aktivitesi olduğu tespit edilen İspanyol Blue (Valdeon) peynirinde *P. roqueforti* tarafından salgılanan peptidazların aktivitesinden (esas olarak alkalın aminopeptidazlar) kaynaklı ortalama TCA-SN değerlerinde 15 gün ile olgunlaşma sonuna kadar önemli derecede artış meydana geldiğini bildirmişlerdir (Diezhandino vd., 2015).

Yardımcı kültür olarak *P. roqueforti* kullanılan Gorgonzola tipi peynir için 49 günlük olgunlaşmanın sonunda *P. roqueforti*'den kaynaklı ek enzim aktivitesi nedeniyle %12 TCA değerinin beklenildiği seviyelerde olduğu ancak hammadde ve üretim teknolojilerindeki farklılıkların olgunlaşma modelini etkileyebildiğini belirtmişlerdir (Moreira vd., 2018).

4.3.2.2. Toplam serbest amino asit miktarı

Proteinlerdeki toplam serbest amino asit miktarları, amino asitlerin fonksiyonel amino grupları kromofor bir madde (Cd-Nr) ile boyandıktan sonra belirlenmektedir (Wallece ve Fox. 1998). Toplam serbest amino asit miktarları spektrofotometrik olarak 507 nm'de saptanmış ve absorbans değerleri standart eğriye göre mg Leu/L'ye dönüştürülmüştür. Bulguların değerlendirilmesi yapılırken mg Leu/kg cinsinden sonuçlar dikkate alınmıştır. Peynirlerin TFAA asit miktarları sırasıyla Çizelge 4.12 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. 15 ve 25 nolu örneklerdeki TFAA artış oranından anlaşılabileceği üzere depolama sıcaklığına oranla bulamaç ilavesinin etkisi daha çok olmuştur.

Çizelge 4.12 Peynir örneklerinin toplam serbest amino asit değerleri mg Leu/kg

Günler	25	15	27	28
1	10.89±0.82 ^{a.A}	20.02±0.44 ^{b.A}	22.11±0.68 ^{c.A}	28.43±0.85 ^{d.A}
15	27.71±0.51 ^{a.B}	28.98±0.29 ^{a.B}	49.85±1.50 ^{b.B}	74.26±0.87 ^{c.B}
30	43.29±1.22 ^{a.C}	53.57±1.74 ^{b.C}	105.97±1.65 ^{c.C}	123.87±1.21 ^{d.C}
60	107.98±1.43 ^{a.D}	133.06±1.89 ^{b.D}	254.64±2.41 ^{c.D}	288.61±1.96 ^{d.D}

^{a, b, c, d} : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C,D} : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

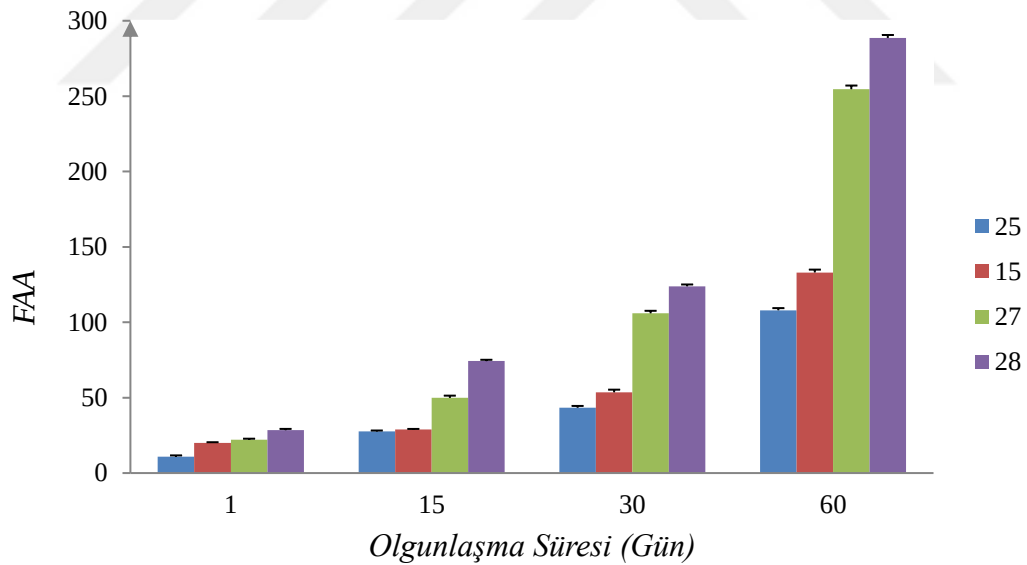
Çizelge 4.13'de örneklerin TFAA değerlerine istatistiksel olarak bütün değişkenlerin etkisinin olduğu anlaşılmaktadır ($P<0.01$). TFAA değerlerindeki farklılıklar proteolizin bulamaç ilavesi ile daha hızlı olduğunu göstermektedir. Olgunlaşma süresince peynirlerin toplam serbest amino asit konsantrasyonunda önemli bir artış olmuştur. Peynirlerin toplam serbest amino asit konsantrasyonunun olgunlaşma süresi ilerledikçe genellikle doğrusal bir artış gösterdiği diğer çalışmalarda da belirlenmiştir (Şahingil, 2012; Kandarıkis vd., 2001; Hayaloglu, 2003. 2007; Mallatou vd., 2004; Cinbaş ve Kılıç, 2006; Pappa ve Sotirakoglou, 2008).

Model peynirlerdeki toplam FAA seviyesi bazı araştırmacılar tarafından belirtildiği gibi çözünür azot fraksiyonları (WSN veya TCA-SN) ile benzerlik göstermiştir (Hayaloglu, 2007; Sulejmani, 2014). Azarnia vd. (2011), Cheddar peynirindeki toplam FAA değerlerinin

depolama süresi ve üretiminde kullanıldıkları artan aminopeptidaz enzim konsantrasyonuna bağlı olarak peynirler için önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Olgunlaşmanın 60. gününde aynı sıcaklıkta depolamada toplam FAA değeri kontrol peynirinde 107.98 mg Leu/kg iken, bulamaç ilavesi ile 254.64-288.61 mg Leu/kg düzeyine çıktığı belirlenmiştir. Bir çalışmada model peynirlerdeki toplam FAA miktarı olgunlaşmanın 90. gününde kontrol peynirinde 202.43 mg Leu /kg iken, laktobasil ilaveli peynirlerde 300 ile 408 mg Leu/kg arasında değişmiştir (Sahingil vd., 2019).

Çizelge 4.13 Peynir örneklerinin TFFA varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	32.451.320	19.700.141	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	21.157.801	12.844.213	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	73.581.593	44.668.990	0.000
B*OS	6.482.775	3.935.481	0.000
S*OS	6.187.262	3.756.086	0.000



Şekil 4-11 Olgunlaşma süresince saptanan TFAA değerleri

En yüksek artış 27 ve 28 nolu örneklerde gerçekleşmiştir. Olgunlaşma sıcaklığı düşük tutulan 15 nolu örnekteki toplam serbest amino asit miktarındaki artma eşdeğeri 27 nolu örneğe sıcaklık farkından dolayı az olsa da, kontrol örneği olan 25 nolu örneğe göre yüksek bulunmuştur. Bulamaç ilavesinin toplam serbest amino asit miktarındaki etkisinden dolayı

olgunlaşmanın başlangıcından beri örnekler arasındaki serbest amino asit değerleri arasında istatistiksel düzeyde önemli farklılıklar bulunmaktadır ($P<0.05$).

4.3.2.3. Amino asit kompozisyonu

Peynir örneklerinde olgunlaşmanın 1, 30 ve 60. gününde belirlenen serbest amino asit değerleri mg/100 g peynir olarak ve her bir amino asidin toplam amino asit miktarındaki % oranları Çizelge 4.14’de verilmiştir. Belirlenen serbest amino asit kompozisyonları 1. gün Şekil 4.12’de, 30. gün Şekil 4.13’de ve 60. gün Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Konya küflü peynir bulamacı ilavesi ve sıcaklık değişkenleri peynirlerin amino asit kompozisyonu üzerine etkili olmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.14 Peynir örneklerinin serbest amino asit değerleri (mg/100 g) ve % oranları

	Günler	25		15		27		28	
		Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı
Ala	1	2.63±0.66	5.41	5.60±0.21	6.90	4.96±0.26	7.23	6.07±0.38	7.36
	30	8.79±0.02	5.47	19.86±0.16	12.02	44.66±0.24	15.59	51.82±1.49	11.88
	60	36.05±0.19	9.68	53.25±0.19	16.22	81.11±2.66	13.47	156.82±6.3	16.16
Arg	1	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	30	2.20±0.02	1.37	0.00±0.00	0.00	2.71±0.03	0.94	2.83±0.22	0.65
	60	2.62±0.05	0.70	2.60±0.05	0.79	2.31±0.20	0.38	2.49±0.54	0.26
Asn	1	0.00±0.00	0.00	0.52±0.04	0.64	0.39±0.09	0.57	0.63±0.03	0.76
	30	0.71±0.00	0.44	1.77±0.04	1.07	6.07±0.02	2.12	8.94±0.12	2.05
	60	3.66±0.01	0.98	4.67±0.01	1.42	22.4±0.02	3.72	9.56±0.39	0.98
Asp	1	0.00±0.00	0.00	3.46±0.18	4.26	3.60±0.34	5.25	3.19±0.01	3.87
	30	3.19±0.30	1.99	2.98±0.00	1.80	3.46±0.68	1.21	4.34±1.93	1.00
	60	3.41±0.07	0.92	4.97±0.16	1.51	11.58±0.08	1.92	6.38±0.64	0.66
Cys	1	1.66±0.91	3.41	1.03±0.03	1.27	1.08±0.01	1.58	1.03±0.01	1.25
	30	1.73±0.22	1.08	1.56±0.01	0.95	1.33±0.20	0.46	2.76±0.19	0.63
	60	2.96±0.07	0.79	1.75±0.06	0.53	1.93±0.02	0.32	2.76±0.29	0.28
Gln	1	0.89±0.16	1.83	1.70±0.14	2.09	1.16±0.04	1.69	1.85±0.00	2.24
	30	1.26±0.02	0.78	2.50±0.05	1.51	6.19±0.15	2.16	6.76±0.27	1.55
	60	4.37±0.32	1.17	6.92±0.01	2.11	19.34±0.17	3.21	35.86±0.42	3.70
Glu	1	1.74±0.28	3.59	3.27±0.07	4.03	0.86±0.50	1.26	0.88±0.39	1.07
	30	0.82±0.35	0.51	0.77±0.10	0.47	0.56±0.00	0.20	1.08±0.02	0.25
	60	1.17±0.04	0.31	1.23±0.03	0.37	1.19±0.01	0.20	0.58±0.09	0.06

Çizelge 4.14 (devamı)

	Günler	25		15		27		28	
		Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı
Gly	1	0.48±0.68	0.99	1.62±0.04	1.99	1.07±0.10	1.56	2.09±0.02	2.54
	30	1.56±0.03	0.97	2.59±0.03	1.57	2.81±0.07	0.98	3.72±0.05	0.85
	60	3.28±0.07	0.88	4.49±0.04	1.37	8.59±0.01	1.43	14.47±0.07	1.49
His	1	2.22±0.13	4.56	2.26±0.07	2.78	2.66±0.21	3.88	3.11±0.02	3.77
	30	3.02±0.02	1.88	2.58±0.00	1.56	2.64±0.06	0.92	2.81±0.28	0.65
	60	9.58±0.01	2.57	2.37±0.06	0.72	3.25±0.59	0.54	0.00±0.00	0.00
Ile	1	0.67±0.05	1.38	4.78±0.09	5.89	4.20±0.86	6.12	5.58±0.05	6.76
	30	5.07±0.05	3.15	9.48±0.04	5.74	17.82±0.10	6.22	27.2±0.36	6.24
	60	16.64±0.36	4.47	18.02±0.54	5.49	42.90±0.47	7.12	98.77±8.27	10.18
Leu	1	1.73±1.74	3.55	7.45±0.23	9.18	9.24±0.67	13.49	12.45±0.04	15.11
	30	32.91±0.19	20.48	42.63±0.08	25.81	84.76±0.05	29.59	123.89±1.85	28.41
	60	72.34±5.02	19.42	98.29±0.25	29.93	171.53±1.31	28.49	252.65±1.84	26.03
Lys	1	9.58±2.72	19.69	16.57±0.66	20.41	16.43±2.08	23.96	15.49±0.09	18.79
	30	10.37±0.1	6.45	14.59±0.02	8.83	33.85±0.81	11.82	42.61±3.54	9.77
	60	48.19±0.46	12.93	23.77±2.23	7.24	24.49±1.04	4.07	40.05±0.53	4.13
Met	1	2.37±0.26	4.88	3.67±0.00	4.52	3.92±0.36	5.73	3.40±2.08	4.13
	30	2.85±0.02	1.77	2.03±0.01	1.23	2.32±0.50	0.81	2.54±0.78	0.58
	60	2.03±0.01	0.55	2.72±0.00	0.83	4.22±0.00	0.70	5.81±0.63	0.60
Phe	1	3.78±0.10	7.76	5.18±0.16	6.38	3.68±4.13	5.37	4.33±5.02	5.25
	30	18.67±0.02	11.62	21.21±0.14	12.84	37.54±0.11	13.11	52.5±3.15	12.04
	60	1.07±0.39	0.29	41.83±0.06	12.74	76.66±1.66	12.73	109.91±7.00	11.32
Pro	1	0.11±0.16	0.23	1.43±0.01	1.76	2.53±0.06	3.69	4.17±0.04	5.06
	30	2.46±0.42	1.53	1.92±0.09	1.16	1.19±0.09	0.41	1.31±0.26	0.30
	60	2.88±0.03	0.77	0.51±0.00	0.15	2.37±1.14	0.39	3.04±1.53	0.31
Ser	1	2.60±0.69	5.34	2.38±0.04	2.93	2.31±0.08	3.37	2.62±0.03	3.18
	30	3.18±0.02	1.98	3.36±0.06	2.03	3.99±0.17	1.39	4.52±0.07	1.04
	60	6.57±0.00	1.76	3.41±0.00	1.04	5.80±0.01	0.96	5.30±0.61	0.55
Thr	1	0.00±0.00	0.00	1.46±0.04	1.79	0.00±0.00	0.00	1.32±0.05	1.61
	30	1.71±0.14	1.06	1.73±0.18	1.05	2.41±0.14	0.84	1.82±0.75	0.42
	60	4.21±0.12	1.13	0.00±0.00	0.00	4.36±0.01	0.72	3.59±3.25	0.37
Trp	1	15.17±2.49	31.19	10.34±1.09	12.74	1.38±1.95	2.01	4.19±0.24	5.08
	30	46.79±0.06	29.12	14.58±0.75	8.83	0±0.00.00	0.00	47.76±1.07	10.95
	60	119.35±0.28	32.03	18.67±0.95	5.69	43.62±1.75	7.24	88.22±6.77	9.09
Tyr	1	0.28±0.31	0.57	1.83±0.05	2.26	2.01±0.61	2.93	0.73±0.27	0.88
	30	3.07±0.09	1.91	1.12±0.07	0.68	1.45±0.29	0.51	2.69±0.20	0.62
	60	1.67±0.07	0.45	1.81±0.01	0.55	1.80±0.01	0.30	2.30±0.50	0.24

Çizelge 4.14 (devamı)

	Günler	25		15		27		28	
		Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı	Miktarı	% Oranı
Val	1	2.73±0.33	5.62	6.65±0.17	8.19	7.08±0.13	10.33	9.31±0.07	11.30
	30	10.36±0.02	6.45	17.95±0.03	10.86	30.67±1.12	10.71	44.15±1.25	10.12
	60	30.52±0.12	8.19	37.07±0.01	11.29	72.73±0.11	12.08	131.98±3.35	13.60
Esansiyel	1	38.24±3.36	78.63	58.37±2.26	71.88	48.58±6.07	70.87	59.18±2.41	71.80
	30	131.79±0.09	81.98	126.77±0.44	76.74	212.01±2.61	74.02	345.27±7.28	79.18
	60	303.95±5.73	81.58	242.74±2.38	73.93	443.76±3.71	73.69	730.98±2.22	75.32
Esansiyel Olmayan	1	10.40±0.66	21.37	22.84±0.10	28.12	19.96±0.54	29.13	23.24±1.06	28.20
	30	28.91±1.22	18.02	38.43±0.13	23.26	74.41±0.67	25.98	90.78±2.68	20.82
	60	68.64±0.46	18.42	85.61±0.14	26.07	158.41±1.16	26.31	239.56±2.99	24.68
Genel Toplam	1	48.64±2.71	100.00	81.21±2.36	100.00	68.54±6.61	100.00	82.42±1.35	100.00
	30	160.70±1.13	100.00	165.21±0.31	100.00	286.40±3.28	100.00	436.05±4.60	100.00
	60	372.59±5.27	100.00	328.36±2.24	100.00	602.18±2.55	100.00	970.54±0.77	100.00

Amino asit kompozisyonu, gıda proteini kalitesinin tanımlanmasında en önemli faktördür. Bu faktör proteinin sindirilebilirliği ve amino asitlerinin biyoyararlanımı açısından önemlidir (Lorieau vd., 2018). Peynir örneklerindeki amino asit profilleri ve içerikleri hem bireysel hem de toplam miktarları açısından olgunlaşma süresi boyunca artış göstermiştir. Olgunlaşma periyodu boyunca amino asit miktarlarındaki meydana gelen artış diğer çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Kandarıkis vd., 2001; Hayaloğlu 2003; 2007; Mallatou vd., 2004.; Cinbaş ve Kılıç, 2006; Pappa ve Sotirakoglou, 2008).

Her peynir tipi, enzimatik sistemden ve amino asit dönüşüm ve bozulmasından kaynaklanan kendine özgü bir serbest amino asit (FAA) desenine sahiptir (Niro vd., 2017). Peynirdeki farklı amino asit konsantrasyonu üretim teknolojisine (lor tipi, proteinazların eklenmesi, olgunlaşma koşulları), olgunlaşma zamanı ve proteolizin derecesi ve türüne bağlıdır (Pino vd., 2009). Ayrıca, kullanılan süt türü, peynir mikrobiyotasının bileşimini ve aktivitesini etkilemekte, peynirlerin FAA profili üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptirler. (Pappa ve Sotirakoglou, 2008). Genel olarak amino asit profilleri ve miktarı peynir için kullanılan süt türüne (inek, koyun, keçi veya karışımları), sütün soğutma koşulları, laktik asit bakterileri ortak kültürlerinin kullanılması veya kullanılmaması ve üretimde kullanılan teknolojik prosedürlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Reis Lima vd., 2019).

Proteolizin belirlenmesi, peynirlerin olgunluk durumu ile beraber kalitesini belirlemek amacıyla kullanılan yaygın analizdir (Sousa vd., 2001). Proteolizde kazeinin enzimatik sistem ile yıkımı peynirde çözünür azot fraksiyonu olarak adlandırılan çok miktarda peptitin oluşumuna yol açar. Daha sonra bu peptitler, daha küçük peptitlere ve serbest amino asitlere parçalanır. Amino asit katabolizması peynirde lezzet oluşumu için ana işlemdir. Aslında, FAA lezzet ve tat gelişiminde son derece önemlidir. Örneğin Arg acılık, Pro, Ser ve Asn tatlılıkla ilişkilidir (Izco ve Torre, 2000). Peynirlerdeki acılığa neden olmaları bakımından Leu, Phe ve Pro amino asitleri miktarları önemlidir (Gün, 2012).

Küflü peynir bulamacının ilaveli peynirlerdeki Leu ve Phe amino asit miktarındaki artışa neden olmuştur. Peynirdeki acı tattan sorumlu Met, Phe ve Leu amino asitlerini içeren proteoliz türevli ürünler olduğu belirtilmiştir (Hajj vd., 2019). Bu amino asitlerden kaynaklı peynirlerin duysal değerlendirmesinde tat ve lezzet puanlamalarında düşük sonuçlar almasına neden olduğu düşünülmektedir. Peynir örneklerinde özellikle Leu baskın olmasında bulamaç kaynaklı enzimlerin N-terminal kalıntısı olarak Leu içeren dipeptitleri tercih ettiği söylenebilir (Arora ve Lee, 1994). Aminopeptidaz enzim ilaveli Cheddar peynirlerinde en baskın amino asidin Leu olduğu bildirilmiştir (Azarnia vd., 2011).

Toplam serbest amino asit konsantrasyonu 60. gün 25 nolu peynirde 372.59 mg/100 g, 15 nolu peynirde 328.36 mg/100 g, 27 nolu peynirde 602.18 mg/100 g ve 28 nolu peynirde 970.54 mg/100 g düzeyinde saptanmıştır. Mavi küflü ve yüzeyden olgunlaşan peynirlerde bakteriyel enzimlerin yanı sıra, küf kaynaklı enzimlerin kazein hidrolizinde katkıları olduğundan bu tip peynirlerde serbest amino asit miktarları fazla olmaktadır (Hayaloglu ve Özer, 2011). Üretiminde *P. roqueforti* kültürü kullanılan dünyanın en eski mavi damarlı peynirlerinden Gorgonzola tipi peynir örneğinin olgunlaşmanın 1. günü 79.7 mg/100 g, 35. günü 334.2 mg/100 g ve 49. gününde 471.9 mg/100 g olarak tespit edilmiş ve en fazla miktarda Leu, Val, Phe, Ile, Lys ve Gln amino asitlerine rastlanıldığı bildirilmiştir (Moreira vd., 2018).

Aynı sıcaklıkta olgunlaşmaya bırakılan örneklerimizde küflü peynir bulamacından kaynaklı enzim varlığı nedeniyle amino asit miktarlarında artış meydana gelmiştir. Yan zincirlerinin polaritesine göre nonpolar (Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Phe, Trp ve Val) ve polar (Asn, Glu, Ser, Thr ve Tyr) amino asitler ile asidik (Asp ve Glu) ve bazik (Arg, His ve Lys) olarak gruplandırılırlar (Ouellette ve Rawn, 2018). Nonpolar yan zincirli amino asitler hidrofobik, polar yan zincirli amino asitler hidrofilik özellik göstermektedir. Bulamaç ilavesi ile miktarlarında artma olan Ala, Ile, Leu, Phe, Trp ve Val amino asitleri hidrofobik özellik

göstermektedirler. Hidrofobik amino asitlerin ACE inhibitör ve antioksidan aktivite gibi bioaktif rolleri bulunmaktadır (Koçak vd., 2020).

Farklı laktokok starterlerin kullanılarak Beyaz peynirdeki proteolize etkisinin araştırıldığı bir çalışmada aynı zamanda serbest amino asit miktarında da farklılık gözlemlendiği bildirilmiştir. Beyaz peynir örneklerinde Leu, Glu, Phe, Val, Lys ve Arg miktarlarında meydana gelen farklılıkların, starterlerin sahip olduğu enzim sistemi ve otoliz derecelerinden olduğunu belirtmişlerdir (Hayaloğlu vd., 2004).

Eşdeğeri olan 27 nolu örneğe ve 25 nolu kontrol örneğine göre düşük derecede muhafaza edildiğinden en düşük serbest amino asit konsantrasyonu 15 nolu örnekte çıkmıştır. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi olgunlaşmanın 60. gününde en fazla miktarda Leu, Ala, Val, Phe, Ile, Trp, Lys, Gln ve Gly amino asitlerine rastlanılmıştır. Çeşitli peynir örneklerinde yapılan çalışmalarda miktar olarak çok bulunan amino asitlerin Leu, Lys, Val, Ala ve Glu olduğu bildirilmiştir (Fenelon vd., 1999; Moatsou vd., 1999; Hayaloglu, 2003).

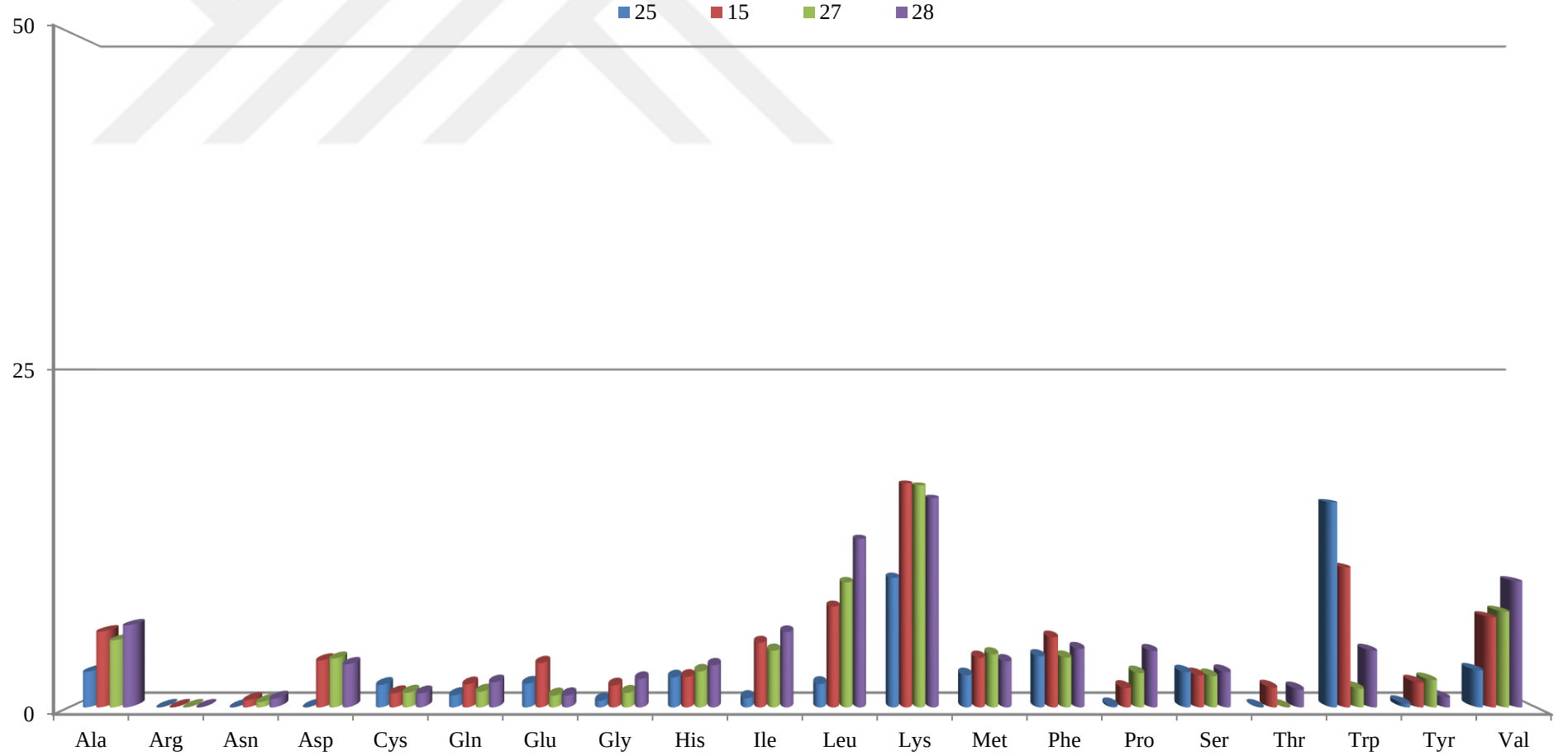
Bu amino asitlerden özellikle Leu, Ala, Val, Phe, Ile, Gln ve Gly miktarları kontrol örneğinde daha fazla belirlenmiştir, Peynirlerin esansiyel aminoasitlerin temininde önemli bir payı bulunmaktadır (Demirci, 1990). Yüksek sıcaklık ve özellikle bulamaç ilavesi ile esansiyel amino asit miktarında belirgin bir artış meydana gelmiştir. Artış miktarının gözlemlendiği esansiyel aminoasitlerden Ile, Leu, Phe ve Val miktarı olgunlaşmanın 60. gününde toplam amino asit konsantrasyonunun yaklaşık %60’lık kısmını oluşturmuştur. Esansiyel olmayan aminoasitlerden ise Ala, Gln ve Gly miktarlarının artmasında etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. Ancak Lys ve Trp miktarları diğer örneklere göre kontrol örneğinde daha fazla miktardadır (Çizelge 4.14).

Beyaz, Kaşar ve Tulum peynir örneklerinin amino asit profillerinin karşılaştırmalı bir çalışmada Gln, His, Ala, Ile, Lys amino asitlerinin bütün peynir çeşitlerinde baskın oldukları bildirilmiştir. Beyaz peynir; Kaşar ve Tulum peynirine oranla daha düşük miktarda bulunmuştur, Esansiyel aminoasitlerden Leu, Lys, Trp ve Val Tulum peynirinde Phe amino asiti ise Kaşar peynirinde önemli miktarlardadır (Ayağ, 2017). Mavi tip peynirlerde ise Phe ve Lys baskınlığı bildirilmiştir (Yvon ve Rijhen, 2001; Korös vd., 2008).

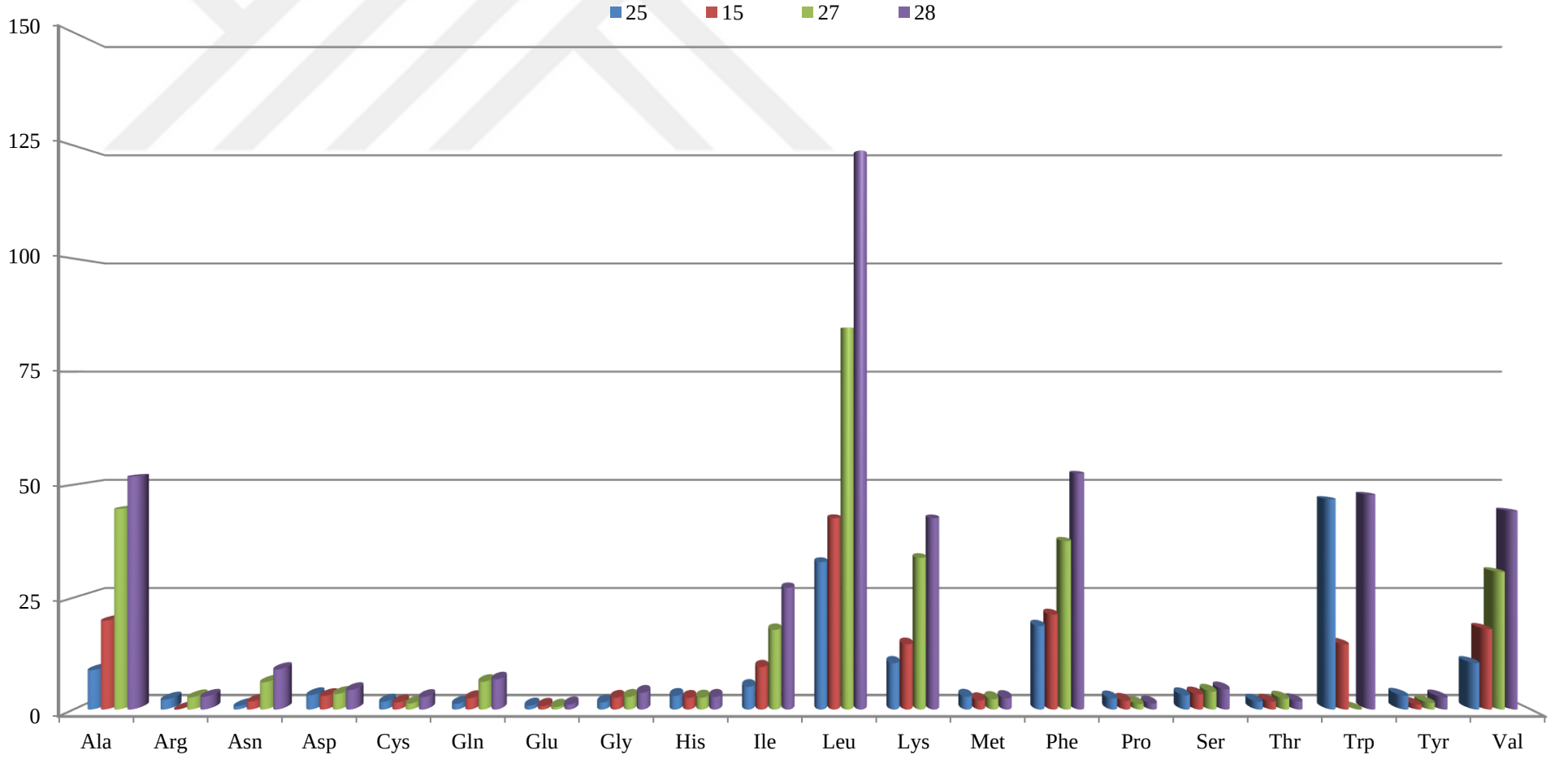
Beş farklı yenilebilir deniz yosununun üretiminde kullanıldığı Ibérico yarı sert peynirinin biyokimyasal özelliklerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, her peynir örneğinde farklı amino asit kompozisyonu ve miktarına sahip olduğunu, bunun ise deniz yosunlarından gelen peptidazların spesifik aktivitesi ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir (del Olmo vd., 2019).

Olgunlaşmanın 60. gününde 15 nolu örnek bulamaç ilavesine rağmen 25 nolu kontrol örneğine göre düşük amino asit miktarına sahiptir. Depolama sıcaklık farkında serbest amino asit miktarı üzerine etkisini ortaya koymuştur, Yapılan bir çalışmada Beyaz peynir örneklerinden 10 °C’de depolananların 5 °C’de depolamaya oranla daha fazla serbest amino asit miktarına sahip olduklarını bildirmişlerdir (Al-Otaibi ve Wilbey, 2004).

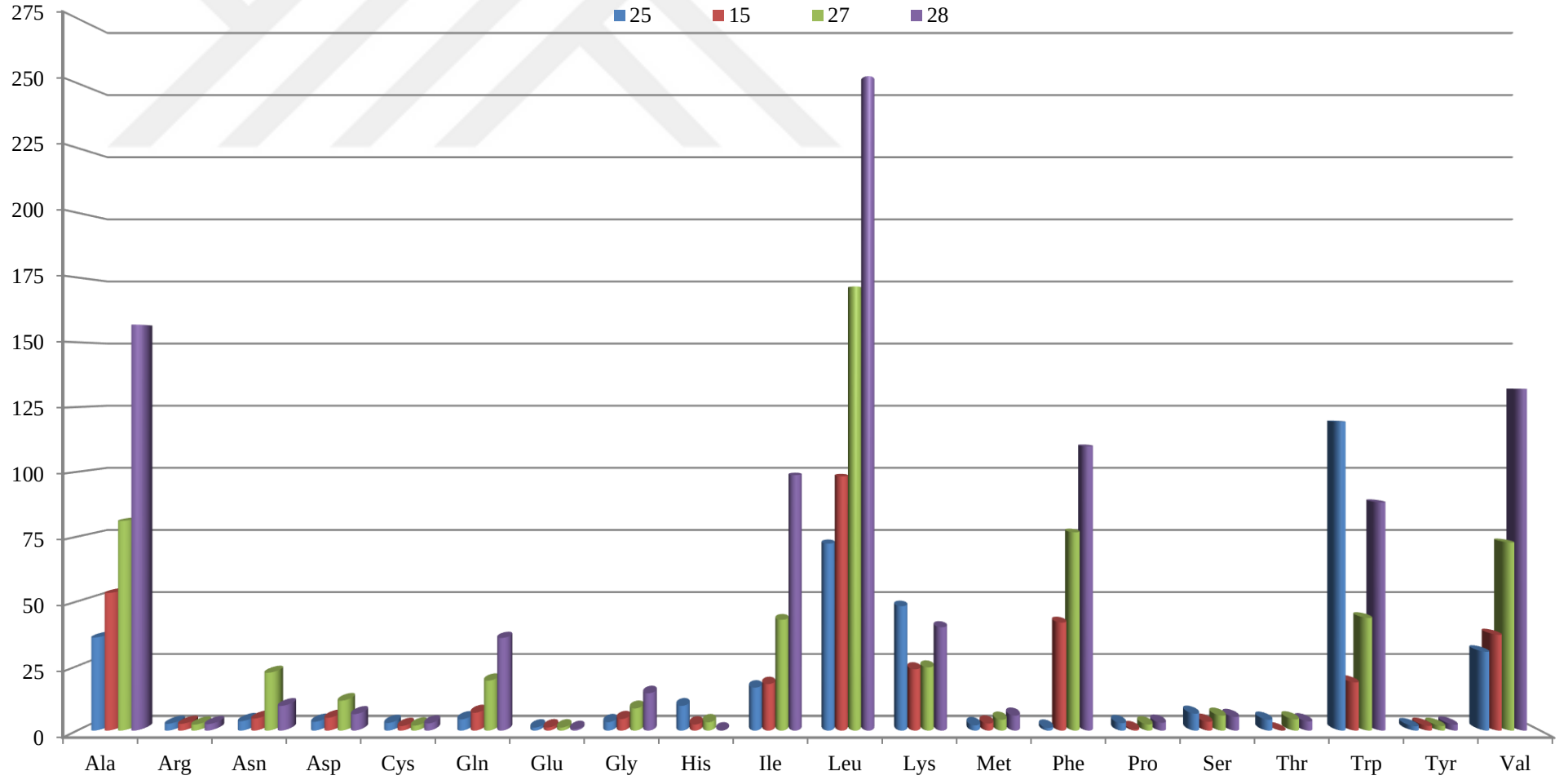




Şekil 4-12 Olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu (mg/100 g)



Şekil 4-13 Olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu



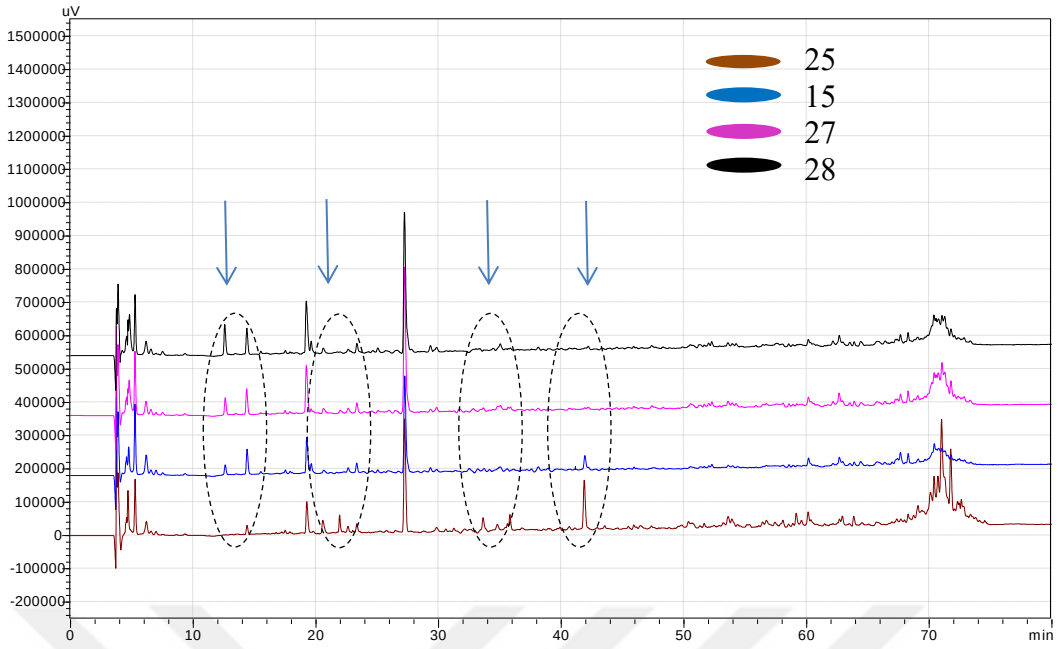
Şekil 4-14 Olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen amino asit kompozisyonu

4.3.2.4. Ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile belirlenen peptit profili

RP-HPLC tekniği, peynirde olgunlaşma süresince meydana gelen ikincil proteolizi saptamada başvurulmuş en yaygın ve en önemli yöntemlerden biridir (Hayaloglu, 2003; Parente vd, 2012; Ceruti vd, 2012). HPLC kromatogramlarında oluşan pik sayısı, yüksekliği ve oluştuğu alan (hidrofilik ve hidrofobik bölge) peynirlerde sekonder proteoliz hakkında önemli bilgiler vermektedir. Peynir ekstraktlarının RP-HPLC kromatogramları farklı molekül ağırlıklarındaki peptitlerin dizilimini gösterdiği (McSweeney ve Fox, 1997) ve peynirlerin peptit konsantrasyonları arasındaki farklılığı belirgin bir şekilde ortaya koyduğu bilinmektedir (Law vd, 1992). Peynirdeki peptitleri RP-HPLC tekniği ile ayırmanın mekanizması, çözünmüş moleküllerin ters adsorbsiyon/desorbsiyon prensibine dayanmakta olup, sabit fazın hidrofobiklik derecesine göre değiştiğinden, daha az hidrofobik olan moleküller (hidrofilik peptitler) ilk önce pik verecek, bunları hidrofobik özellikleri artan peptitler izleyecektir (Pripp vd., 1999). Peynirlerin %70 etanolde çözünen ve çözünmeyen alt fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri belirlenmiş ve bunların olgunlaşma süresindeki değişimleri incelenmiştir,

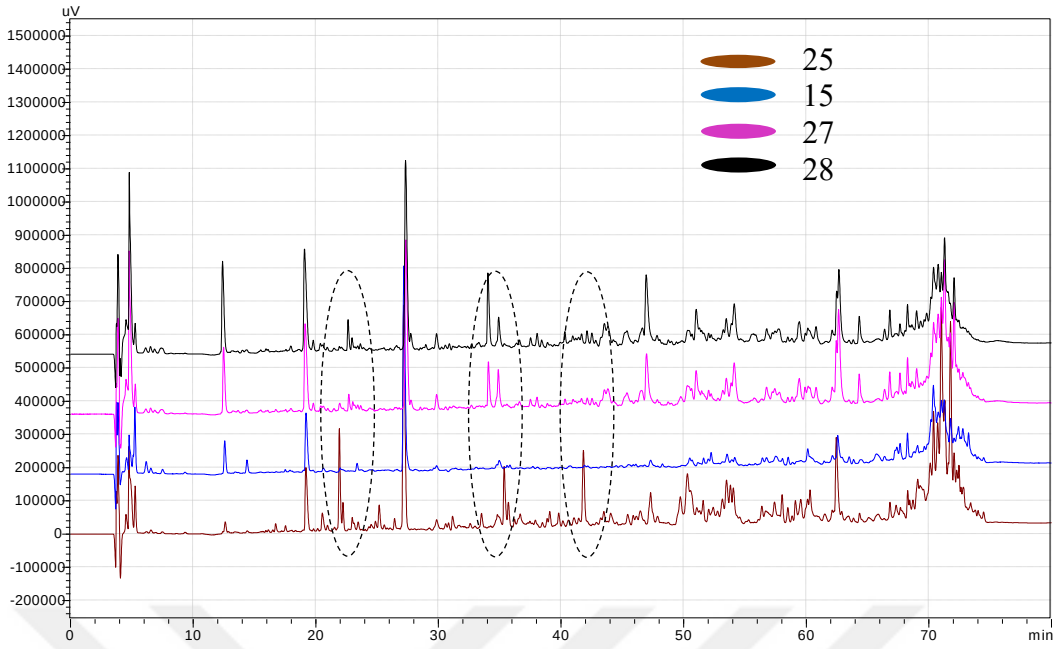
4.3.2.4.1. %70 Etanolde çözünen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri

Peynirlerin %70 etanolde çözünen (EtOH-sol) fraksiyonlarının olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerindeki RP-HPLC peptit profilleri Şekil 4.15-4.18'de gösterilmiştir. Şekillerde görüldüğü üzere olgunlaşma süresi ilerledikçe özellikle 30. ve 60. günlere ait kromatogramlarda görülen piklerin sayısında ve yüksekliğinde artış olmuştur. Danimarka mavi peynirindeki proteolizine ilişkin 9 haftalık olgunlaşma sırasında hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgelerdeki piklerin sayısı ve boyutunda 4. hafta ve 9. haftaya kadar olan dönemde gözlemlenmiştir. 4. haftaya ait kromatogramda peptit boyutlarındaki artma zamanının *P. roqueforti*'nin gelişme ve enzimlerinin aktif olduğu dönemine denk geldiğini belirtmişlerdir (Mane vd., 2019).



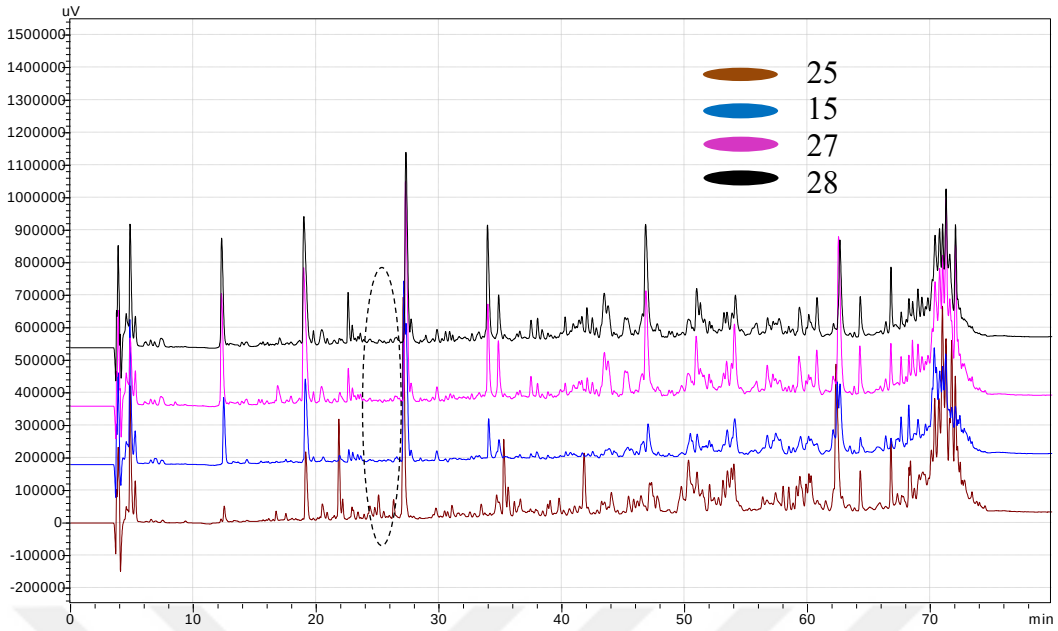
Şekil 4-15 Peynirlerde olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri

Olgunlaşmanın ilk gününde alıkonma zamanının 12. dakikasında 27 ve 28 nolu örneklerde belirgin olan pik 25 nolu peynir örneğinde görülmemiştir. Bu pik 15 nolu peynir örneğinde 30. gün ve 25 nolu örnekte ise 15. ve 30. gün kromatogramlarında zayıf gözlenirken 60. güne ait pik varlığında artış olmuştur. Alıkonma zamanının 14. dakikasında görülen pik 15 nolu örnekte 30. günde, diğer örneklerde ise 15. günden itibaren kaybolmuştur. Olgunlaşmanın 1., 15. ve 30. günlerinde sadece 25 nolu örnekte alıkonma süresinin 23. dakikasında görülen pik, 15 nolu peynir örneğinin 60. gününde gözlenmiştir. Alıkonma sürelerinin 34. ve 36. dakikalardaki pikler olgunlaşma süresi boyunca sadece 25 nolu peynir örneğinde gözlenmiştir. 42. dakikada gözlenen 25 nolu örnekte belirgin ve 15 nolu örnekte düşük pik konsantrasyonu olduğu görülmektedir. 15 nolu örnekte bu pik, 15. günden sonra kaybolmuştur.



Şekil 4-16 Peynirlerde olgunlaşmanın 15. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri

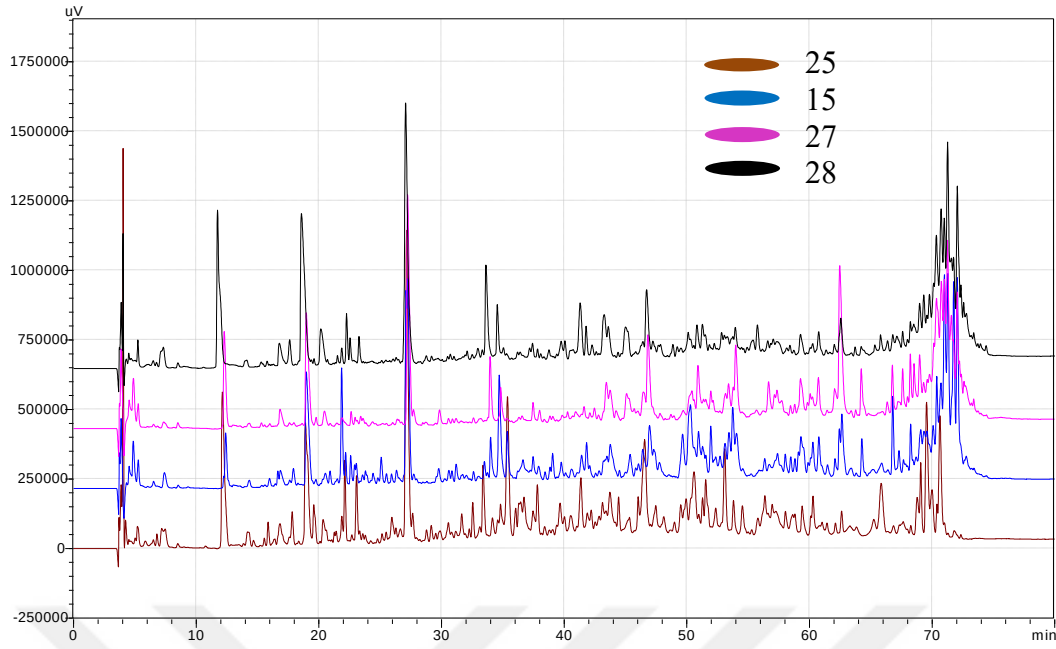
Olgunlaşmanın 15. günü 27 ve 28 nolu örneklerine ait kromatogramlar benzerlik göstermiştir. Kontrol örneğinde ise pik varlığına bağlı olarak farklı peptit profillerinin oluşmaya başladığı ve 15 nolu örnekte proteolizin yavaş ilerlediğine ilişkin peptit varlığının düşük seviyelerde olduğunu gösterir piklerin sayısının ve konsantrasyonlarının çok düşük olduğu söylenebilir. Özellikle hidrofobik peptitlerin bulunduğu bölgede 15 °C’de depolanan 25, 27 ve 28 nolu örneklerde çok sayıda pikin belirdiği görülmektedir. Pik varlığındaki artışı olgunlaşma sıcaklığına bağlı olarak proteolizin daha hızlı gerçekleştiğini göstermektedir. 27 ve 28 nolu örneklere ait kromatogramlar birbirleriyle benzerlik göstermekte olup, ancak bazı alıkonma sürelerine ait gözlemlenen piklerin konsantrasyonları 28 nolu örnekte daha fazladır. 25 nolu örnekteki birkaç alıkonma sürelerine ait peptit profilleri heterojen görünüm verirken, 27 ve 28 nolu örneklerde daha belirgin peptit profilleri gözlenmektedir. Alıkonma süresinin 35. ve 35.5 inci dakikalarına ait pikler 15 ve 25 nolu örneklerde bulunmamaktadır. Proteolizin yavaş gerçekleştiği 15 nolu peynir örneğinde bu alıkonma sürelerine ait pikler 30. günden itibaren görülmeye başlanmıştır.



Şekil 4-17 Peynirlerde olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri

Olgunlaşmanın 30. gününde 15 nolu peynir örneğinde 27 ve 28 nolu örnekle benzer kromatogram sergilediği, ancak pik yüksekliklerinin düşük olduğu görülmektedir. Kontrol örneği olan 25 nolu örnekle farklı pik çeşitliği daha belirgin hale gelmeye başlamıştır. 25 nolu peynirde hidrofilik bölgedeki peptit profilleri diğer örneklerle göre daha fazladır. 24. ve 26. dakika aralığında görülen peptitler diğer örneklerde görülmemiştir.

60. günde 15 ve 25 nolu örneklerdeki özellikle kromatogramın hidrofilik bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda peptit varlığı gösterdiği saptanmıştır. Bu durum artan olgunlaşma süresi ve sıcaklığı ile daha da belirgin hale gelmiştir. EtOH-sol fraksiyonunda olgunlaşmaya bağlı olarak elüe edilen peptitler kontrol örneğinde heterojen görünüm mevcutken proteolizin hızlı ilerlediği 27 ve 28 nolu örneklerde daha belirgindir. Olgunlaşmanın 60. gününde serbest amino asit miktarındaki artıştan dolayı pik yüksekliklerinde azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.14). Hannon vd. (2003) RP-HPLC ile peptit profili analizi sonucunda pik yüksekliklerindeki azalmanın, serbest amino asit miktarındaki artışı yansıttığını ifade etmişlerdir.



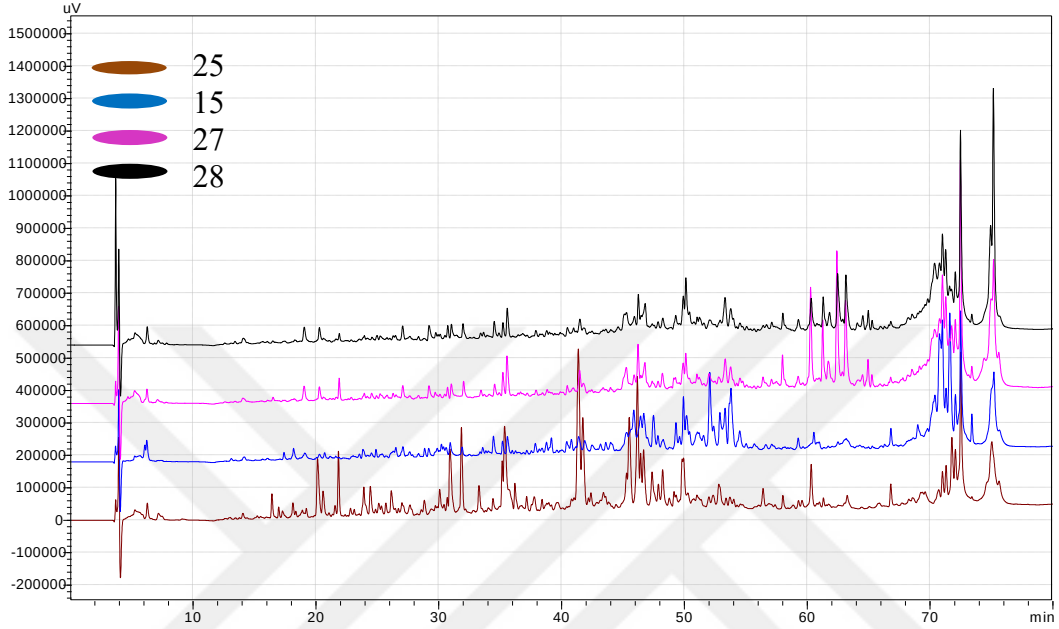
Şekil 4-18 Peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen %70 etanolde çözünen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri

4.3.2.4.2. %70 Etanolde çözünmeyen fraksiyonlar RP-HPLC peptit profilleri

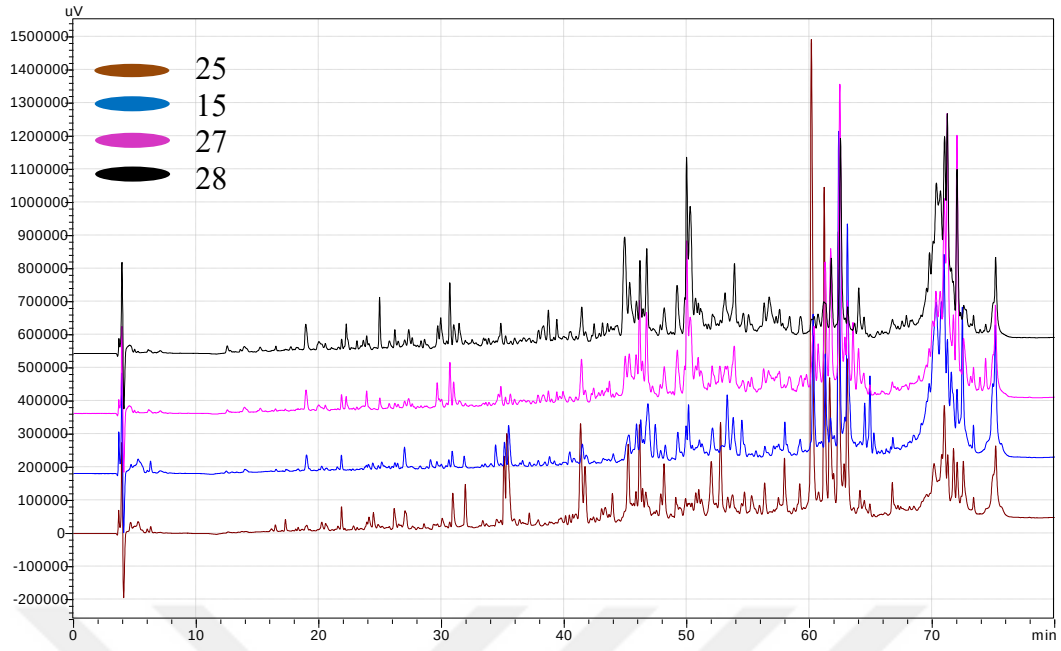
Peynirlerin %70 etanolde çözünmeyen (EtOH-insol) fraksiyonlarının olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerindeki RP-HPLC peptit profilleri Şekil 4.19-4.22'da gösterilmiştir. %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonlar daha yüksek moleküllü ve hidrofobik peptitlerden oluştuğundan bütün peynir örneklerinde alıkonma süresinin 20. dakikasına kadar önemli düzeyde bir pik gelmemiştir. Şekillerde görüldüğü üzere olgunlaşma süresi ilerledikçe kromatogramlarda görülen piklerin sayısında ve yüksekliğinde artış olmaktadır. Kontrol örneği olan 25 nolu peynirin dışında kalan diğer örneklerin peptid kromatogramları benzerlik göstermişlerdir. Genel olarak ACE-inhibitör peptitlerinin hidrofobik aminoasit içeren kısa zincirli, düşük molekül ağırlığına sahip peptitler olduğu (Hayes ve Tiwari, 2015), bu peptitler peynir olgunlaşması sırasında daha düşük molekül ağırlıklı peptitlere ve amino asitlere parçalandığından (Gupta vd., 2013) peynir örneklerindeki ABTS^{*+} antioksidan ve ACE inhibisyon aktivitesindeki değişim ile elüe edilen kromatogramlar ile benzerlik göstermiştir.

%70 EtOH-i fraksiyonları peptit profilleri ile ilgili olarak, 0 ila 20 dakika (hidrofilik bölge) arasında elüe edilen peptit konsantrasyonları, 40 ila 70 dakika arasındaki (hidrofobik bölge) elüe edilenlerden daha düşüktür. Hidrofilik bölgede örnekler arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Bu, hidrofilik peptitlerin %70 EtOH-s fraksiyonlarında çözünür olduğunu

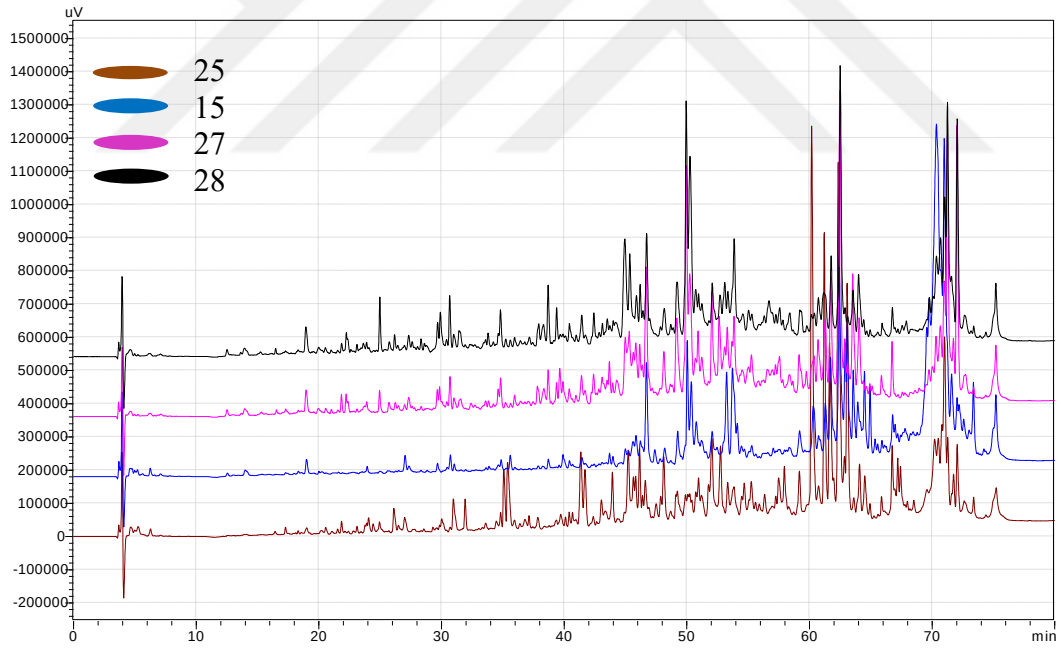
gösterirken, hidrofobik peptitlerin esas olarak EtOH-i fraksiyonunda olduğu gösterilebilir (Kırmacı vd., 2014). Hidrofobik peptitlerin konsantrasyonları olgunlaşma sırasında bütün örneklerde artış göstermiştir. Bu da hidrofobik peptitlerin varlığı özellikle acılık veya yabancı tat gelişimini işaret ettiğinden (Hayaloğlu vd., 2004), olgunlaşma ilerledikçe duyuusal değerlendirmede puan düşüklüğüne neden olmuştur.



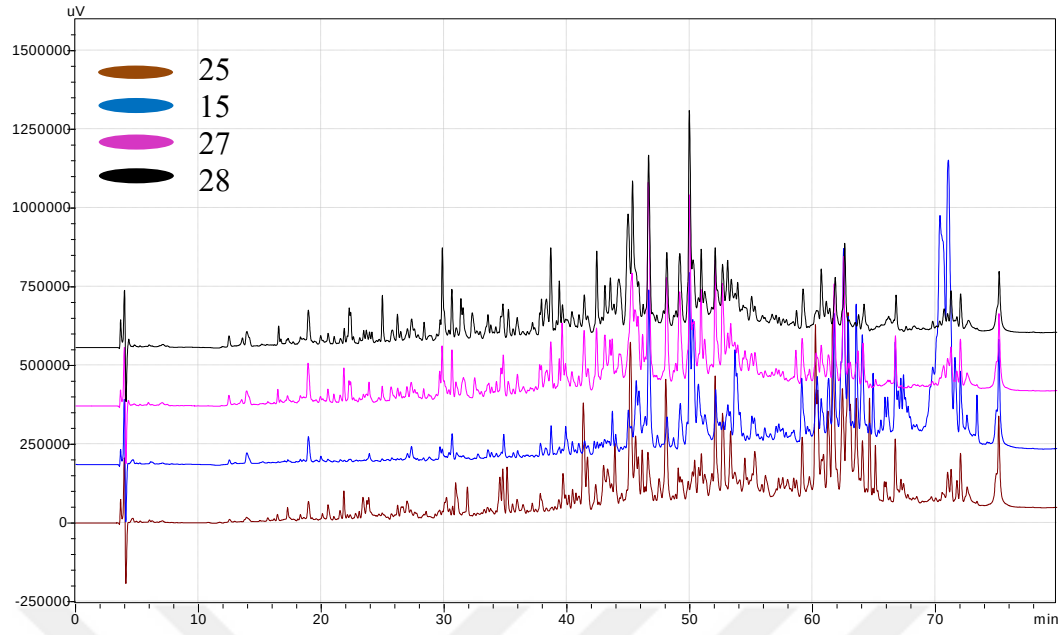
Şekil 4-19 Peynirlerde olgunlaşmanın 1. gününde belirlenen % 70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri



Şekil 4-20 Peynirlerde olgunlaşmanın 15. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri

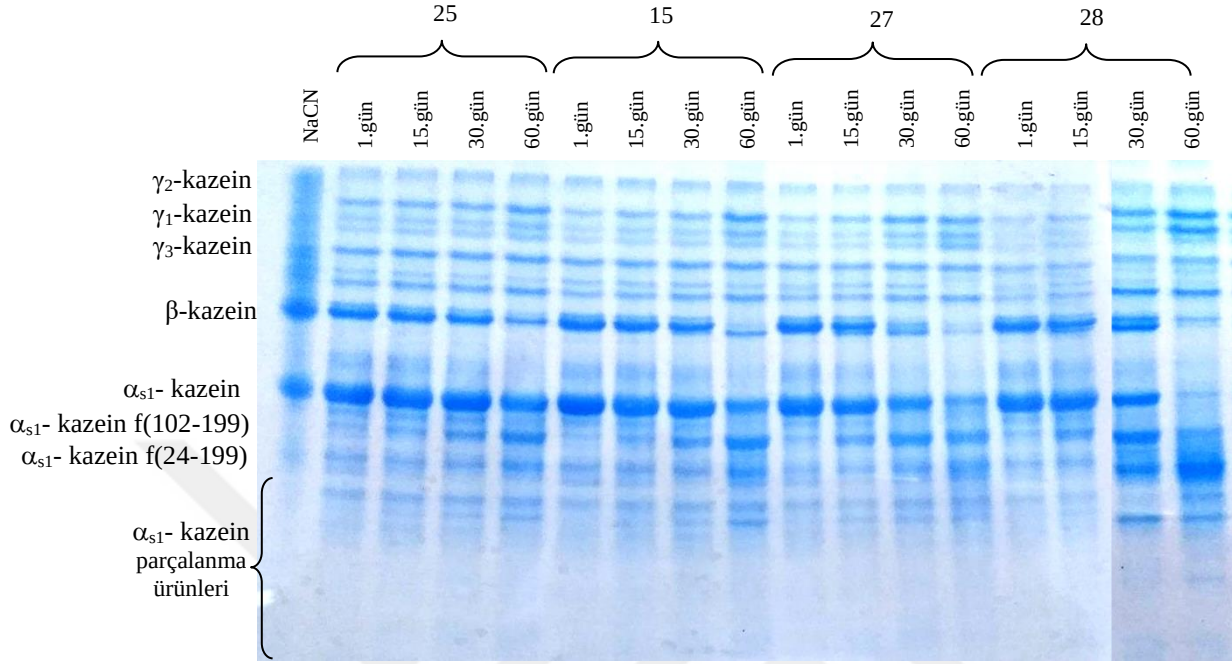


Şekil 4-21 Peynirlerde olgunlaşmanın 30. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri



Şekil 4-22 Peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri

4.3.2.5. Üre-Poliakrilamid jel elektroforez (Üre-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi



Şekil 4-23 Peynir örneklerinin urea-PAGE jel elektroforetogramları

Peynirlerin suda çözünmeyen fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.23’de gösterilmiştir. Soldan sağa 1. bant Na-kezinatı, diğer bantlar sırasıyla olgunlaşmanın 1. 15. 30. ve 60. günlerinde peynirlerin suda çözünmeyen kazein fraksiyonlarının elektroforetik özelliklerini göstermektedir.

Olgunlaşma boyunca α_{s1} -kazein ve γ -kazeinler erken parçalanmaya başlamış, ancak α_{s1} -kazeinin parçalanması β -kazeine göre daha hızlı olduğu ve olgunlaşmanın 60. gününde parçalanma düzeyinin hızla arttığı görülmektedir.

α_{s1} -Kazein proteolitik hidrolizasyonu üç kademedede ilerlemektedir. Bunlar sırasıyla pıhtılaştırıcı enzimler, kalıntı pıhtılaştırıcı enzim, sütün doğal enzimleri ve bakteriyel enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Yaşar, 2007). Pıhtılaştırıcı enzimler, α_{s1} -kazeini Phe₂₃-Phe₂₄ bağlarından parçalayarak α_{s1} -kazein (f₁₋₂₃) ve α_{s1} -kazeini (f₂₄₋₁₉₉) parçalamakta, pıhtılaştırıcı enzim, sütün doğal enzimleri ve bakteriyel enzimler α_{s1} -kazeini (f₂₄₋₁₉₉) orta ve küçük büyüklükte peptitlere hidrolize edilmekte ve son olarak bakteriyel enzimler küçük peptitleri (f₁₋₂₃ dahil) amino asitlere parçalamaktadırlar (Dave vd., 2003).

Kazeinlerin parçalanma hızında olgunlaşma sıcaklığındaki artışında etkili olduğu bilinmektedir (Sihufe vd., 2010). Elektroforetogramlar özellikle 27 ve 28 nolu örneğin olgunlaşma dönemindeki protelize bağlı olarak 30. ve 60. günlerde α_{s1} -kazeinin ve β -kazeinin degradasyonlarını net göstermektedir. β ve γ -kazeinlerin parçalanma hızları izoelektrik nokta, pH, mobilité, net yük ve moleköl ağırlıklarındaki farklılıklar ile açıklanabilir (Sharma vd., 2021). β -kazeinin hidrolizine karşılık gelen bantlar olgunlaşmanın 60. gününde 27 ve 28 nolu peynir örneklerinde daha belirgin görölmektedir. Mavi damarlı peynirlerde β -kazeinin ilk parçalanması γ -kazeinlerin plazmin etkisiyle (Zarpoutis vd., 1997) olduğu, devamının ise küf kaynaklı enzimlerin etkisinin olduğu (Mane vd., 2019) bildirilmiştir. Eksojen ticari bir karboksipeptidazın Reggiano peynirinin proteolizi üzerindeki etkisi değerlendirildiği bir çalışmada en yüksek enzim ilavesi oranlarına sahip peynirlerde olgunlaşmanın ilk 2 ayında β -kazeinde derin bir parçalanma hızı gözlenmiştir (Ceruti vd., 2016).

Olgunlaşma süresi ilerledikçe bulamaç ilaveli peynirlerde özellikle 27 ve 28 nolu peynir örneklerinde α_{s1} -kazeinin parçalanmasının daha belirgin olması primer proteoliz seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Primer proteoliz esas olarak kimozine bağlı ve α_{s1} -CN(f24-199) üretilen başlıca büyük peptittir (Sousa vd., 2001). Küflü peynir bulamacının içerdği *P. roqueforti* kaynaklı hücre dışı proteinazların proteolitik aktivitelerinden dolayı çok düşük mobilitéye sahip peptitlerin oluşumunu sağlamaktadırlar (Gripon, 1993; Zarpoutis vd., 1997).

4.3.3. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi

Antioksidan maddelerin en önemli özelliğinin serbest radikalleri yakalaması olduğu belirtilmiştir (Şanlıdere ve Aloğlu, 2010). Suda çözünebilir formdaki 2,2 -Azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) katyon çözeltisi, potasyum persülfat ile ABTS^{•+} radikalinin oksidasyonu ile meydana gelir ve ABTS^{•+} radikali ortamda hidrojen verici bir maddenin bulunmasıyla ve antioksidan zincirlerindeki parçalanmalarla azalabilir. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) ise yağda çözünen bir serbest radikaldir ve elektron ya da hidrojen alarak stabil hale geçer (Phanturat vd., 2010). Bu nedenle DPPH, etanol içerisinde çözünür ve sulu ortamdaki hedef peptitlere kolaylıkla etki edemeyebilir.

Peptidlerin biyolojik aktivite çeşitlerinden birisi de antioksidan özellik göstermeleridir (Sultan vd., 2018; Nielsen vd., 2017). Peynir işleme ve teknolojisi gibi proteolizi etkileyen faktörlerin potansiyel antioksidan peptitlerin salınmasını önemli ölçüde etkileyebileceği

açıktır (Timón vd., 2019). Birçok araştırmacı peynir üzerine yaptığı araştırmalarda olgunlaşma sırasında açığa çıkan biyoaktif peptitlerin varlığına bağlı olarak değişen derecede antioksidan aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir (Abadia-Garcia vd., 2013; Bottesini vd., 2013; Levkov vd., 2014; Branciari vd., Kurcubic vd., 2015). Hidrofobik amino asitlerin çoğunun, peptitlerin radikalleri süpürme özelliğinden dolayı yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir (Yao vd., 2018).

Cheddar peynirinde suda çözünen ekstraktların antioksidan aktivitesini belirleme üzerine yürütülen bir çalışmada DPPH* ve ABTS**+ radikali aktivitelerinin proteoliz derecesi ve ortamdaki mikrofloraya bağlı olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 2009). Bu nedenle suda çözünebilir peptitlerin antioksidan değerini belirlemek için bu araştırmada iki farklı yöntem kullanılmıştır ve ABTS**+ analizine ait değerlerin daha doğru sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Çizelge 4.15’de örneklerin antioksidan kapasite değerlerine varyasyon kaynaklarının istatistiksel olarak etkileri oldukları görülmektedir,

Çizelge 4.15 Peynir örneklerinin antioksidan kapasiteleri varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	ABTS**+			DPPH		
	KO	F	P	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	582.219	22.577	0.000	58.007	2.110	0.132
Depolama Sıcaklığı (S)	1.521.244	58.989	0.000	964.088	35.074	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	5.035.110	195.246	0.000	7.610.704	276.881	0.000
B*OS	67.898	2.633	0.027	18.517	0.674	0.671
S*OS	80.180	3.109	0.035	69.650	2.534	0.068

4.3.3.1. ABTS**+

ABTS**+ sulu ortamda gerçekleştirilen çalışmalarda peptitlere kolaylıkla ulaştığı, suda çözünen ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemede bu yöntemin daha hassas ve uygun olduğu belirtilmiştir (Gupta vd., 2009). ABTS**+ radikalinin hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebildiği ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için daha uygun olduğu ifade edilmiştir (Osman vd., 2006).

Peynirlerin olgunlaşmanın 1. 15. 30. ve 60. günlerine ait antioksidan kapasite Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasiteleri (TEAC) değerleri ile değişimi Çizelge 4.16 ve Şekil 4.24’de verilmiştir. Olgunlaşmanın 1. gününde örneklere ait ABTS**+ değerleri arasında önemli bir farklılık olmazken, olgunlaşmanın ilerleyen dönemlerindeki değerleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

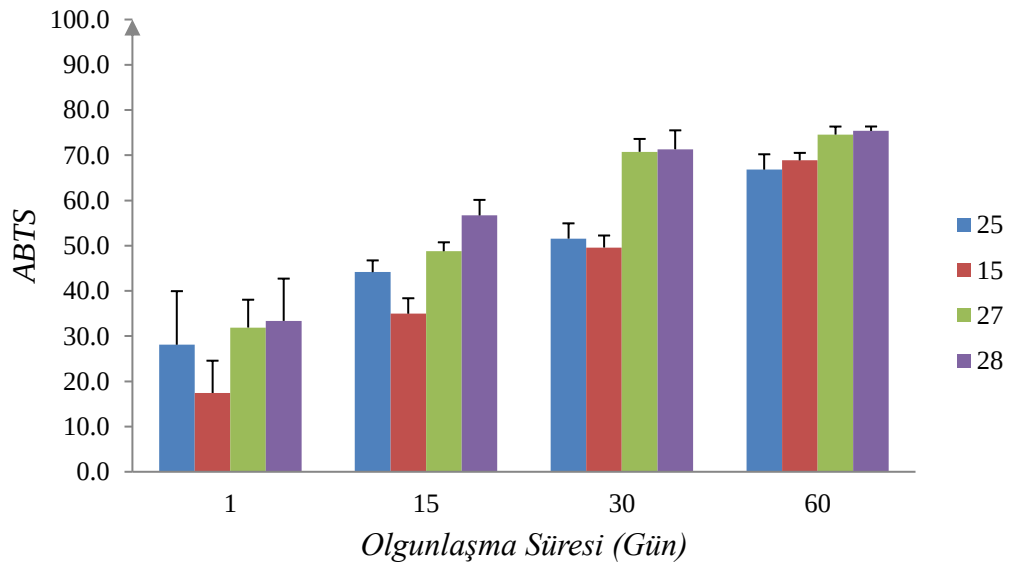
Çizelge 4.16 Model peynir örnekleri ABTS^{*+} değerleri (Trolox mg/L)

Günler	25	15	27	28
1	28.1±11.84 ^{ab,A}	17.42±7.14 ^{a,A}	31.90±6.14 ^{b,A}	33.37±9.35 ^{b,A}
15	44.16±2.58 ^{a,B}	34.96±3.41 ^{b,B}	48.77±1.97 ^{c,B}	56.69±3.43 ^{d,B}
30	51.56±3.38 ^{a,B}	49.59±2.66 ^{a,C}	70.75±2.84 ^{b,C}	71.32±4.17 ^{b,C}
60	66.81±3.39 ^{a,C}	68.86±1.65 ^{a,D}	74.56±1.77 ^{b,C}	75.37±0.98 ^{b,C}

a. b. c. d : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A.B.C.D : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

Olgunlaşma süresince bütün örneklerde ABTS^{*+} değerleri artış göstermektedir. Corrêa vd, (2011) proteinlerin hidroliz süreleri ve Meira vd. (2012) olgunlaşma süreleri ile birlikte TEAC değerinin arttığını bildirmiştir. Kontrol örneği ile aynı depolama sıcaklığına sahip 27 ve 28 nolu peynir örneklerine ait değerler daha yüksek sonuçlar vermişlerdir. 10 °C depolama sıcaklığına sahip 15 nolu örnek olgunlaşmanın 30. gününden itibaren 25 nolu örneğin sahip olduğu değerlerine ulaşmıştır. Model peynir örneklerinde antioksidan aktivitelerinin farklı seyir izlemesi proteoliz düzeyinden, içerdiği mikrofloradan ve depolama sıcaklığı farklılığından kaynaklanmış olabilir. Antioksidan aktivite peynirdeki proteoliz derecelerine bağlı olarak meydana gelen peptit sayısındaki artış ile ilişkilendirilmiştir (Timón vd., 2014; Meira vd., 2012).



Şekil 4-24 Olgunlaşma süresince saptanan ABTS^{*+} (Trolox mg/L) değişimi

Proteinlerin laboratuvar ortamında hidrolizi yoluyla üretilen peptitlerin antioksidan kapasiteleri çok sayıda iyonize olan grup ve hidrofobik grupların açığa çıkması ile ilişkilidir (Sarmadi and Ismail, 2010). Peynir örneklerinin olgunlaşma boyunca belirlenen hidrofobik peptit konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan aktivitesinde artış görülmüştür. Correa vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada bakteriyel proteaz kullanılarak koyun peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizatlarının hidroliz süresi boyunca artan hidrofobiklik indekslerinin ve ABTS^{•+} yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasitelerinin arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır.

27 ve 28 nolu peynir örneklerinde bulunan Konya küflü peyniri bulamacından gelen mikroflora farklılığı ve proteoliz sonucunda meydana gelen biyoaktif peptitlerin çeşidi, sayısı ve aktivitesinden kaynaklanmış olabilir.

4.3.3.2. DPPH*

DPPH'in ise özellikle alkol ortamı olmak üzere sadece organik ortamlarda çözünürken sulu ortamda çözünemediği ve dolayısıyla hidrofobik antioksidanların yorumlanmasında bu durumun sınırlayıcı olduğu bildirilmiştir (Arnao, 2000). Hernández-Galán vd. (2017) starter kültür kullanılmadan üretimini yaptıkları keçi peynirinden elde edilen peptit fraksiyonları arasındaki antioksidan aktivite farklılığının DPPH radikalının hidrofobik antioksidanlar için sınırlı kullanımı olduğundan düşük aktivite tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Peynirlerin olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerine ait antioksidan kapasite DPPH* değerleri ile değişimi Çizelge 4.17 ve Şekil 4.25'de verilmiştir. Çoğu araştırmacı peynirdeki biyoaktif peptitlerin antioksidan özelliğini belirlemek için DPPH* yöntemini kullanmıştır (Gupta vd., 2009; Pritchard vd., 2010; Abadía-García vd., 2013).

Çizelge 4.17 Model peynir örnekleri DPPH* değerleri (Trolox mg/L)

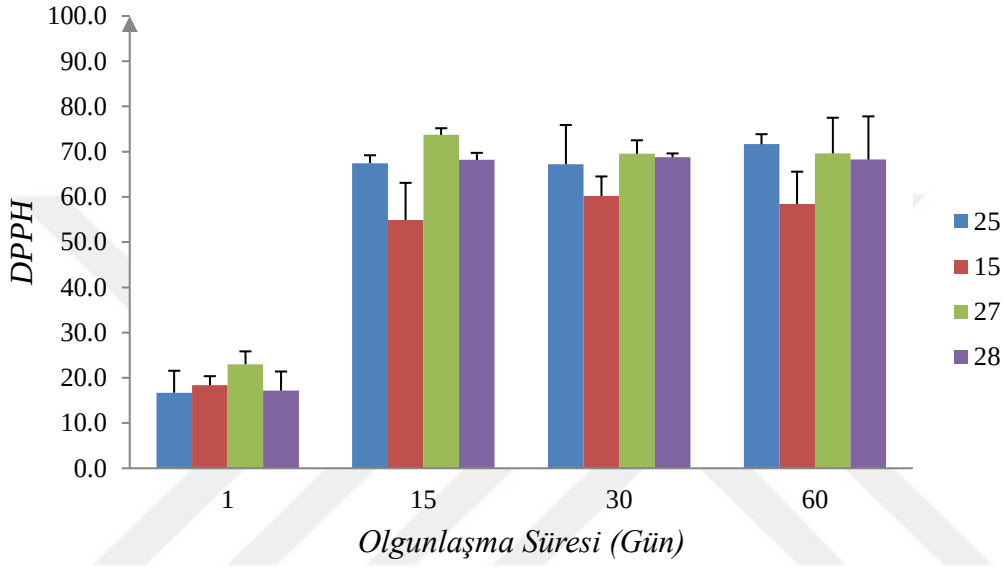
Günler	25	15	27	28
1	16.71±4.85 ^{a.A}	18.39±1.97 ^{ab.A}	23.01±2.84 ^{b.A}	17.18±4.21 ^{ab.A}
15	67.46±1.75 ^{a.B}	54.92±8.19 ^{b.B}	73.73±1.46 ^{a.B}	68.18±1.56 ^{a.B}
30	67.24±8.66 ^{ab.B}	60.22±4.31 ^{a.B}	69.54±2.98 ^{b.B}	68.76±0.86 ^{b.B}
60	71.66±2.20 ^{a.B}	58.47±7.11 ^{b.B}	69.63±7.88 ^{ab.B}	68.26±9.55 ^{ab.B}

^{a, b} : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P < 0.05$ düzeyinde farklıdır.

^{a.B} : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P < 0.05$ düzeyinde farklıdır.

Bulamaç konsantrasyonunun örneklerin DPPH* değerlerine etkili olmadığı, ancak olgunlaşma sıcaklığı ve süresinin istatistiksel olarak değişime katkısının olduğu söylenebilir

($P < 0.01$). Abadía-García vd. (2013)'nın Cottage peyniri üzerinde DPPH* metodu ile gerçekleştirdikleri çalışmada suda çözünebilir ekstraktların antioksidan aktivitesinin depolama zamanı ile arttığını bildirmiştir. Üretiminde çeşitli aromatik bitkilerin kullanıldığı peynirlerin antioksidan seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir. DPPH* metodu kullanılarak yapılan analizlerde en yüksek antioksidan aktivite nane otu içeren beyaz peynirde (297.05 mg/kg), en düşük antioksidan aktivitesi ise bitkinin kullanılmadığı peynirde (98.29 mg/kg) ölçülmüştür (Sülejmani vd., 2020).



Şekil 4-25 Olgunlaşma süresince saptanan DPPH* (Trolox mg/L) değişimi

DPPH* metodu pratik bir yöntem olmasının yanısıra bazı olumsuz yönleri bulunmaktadır. Lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çoğu antioksidan bileşiği çok hızlı tepkime vermesine karşın DPPH* ile verdiği tepkime yavaş gerçekleşmektedir. Sonuç olarak antioksidan kapasitenin doğru bir şekilde ifade edilemediği düşünülebilir (Ardağ, 2008). Ayrıca, DPPH* ile antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon kinetiğinin DPPH* derişimi ile her zaman doğrusallık göstermediği de bilinmektedir (Huang ve Prior, 2005; Molyneux, 2004). Peynir örneklerindeki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliğinden dolayı ABTS*+ ve DPPH* metodları arasında doğrusal ilişki oluşmamasının nedeni olarak söyleyebiliriz.

4.3.4. ACE-İnhibitör aktivitesinin belirlenmesi

Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)-inhibitör peptitlerin etkinliği, peynirin olgunlaşma seviyesi ile ilişkilidir (Meisel vd., 1997; Funglsang vd., 2003; Haque vd., 2009; Korhonen, 2009; Munir vd., 2020).

Çizelge 4.18 Model peynir örneklerine ait ACE-İnhibitör aktivite % değerleri

	Günler	25	15	27	28
ACE-i (%)	1	72.71±0.31 ^{b.A}	62.26±2.75 ^{a.A}	74.23±2.76 ^{b.A}	83.38±0.30 ^{c.A}
	15	74.83±4.73 ^{a.A}	73.38±2.86 ^{a.B}	80.92±1.01 ^{ab.B}	87.21±0.45 ^{b.B}
	30	78.75±4.02 ^{a.A}	83.34±3.59 ^{a.C}	82.91±0.10 ^{a.BC}	89.01±1.51 ^{b.B}
	60	87.37±2.77 ^{a.B}	87.91±0.38 ^{a.C}	88.37±3.54 ^{a.C}	91.32±1.49 ^{a.C}

^{a, b, c} : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C} : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

Peynir örneklerinin olgunlaşması sırasında belirlenen ACE-inhibitör aktivite değerleri ve değişimi Çizelge 4.18 ve Şekil 4.26’da gösterilmiştir. Peynir üretiminde ilave küflü peynir bulamacı ve depolama sıcaklığına bağlı olarak ACE-i aktivite değerleri farklılık göstermiştir. 1. gün en düşük 15 nolu kontrol örneğinde % 62.26 iken en yüksek değer % 83.38 ile 28 nolu örnekte ölçülmüştür. ACE-i peptidleri hayvansal proteinlerden özellikle süt ürünlerinden, bitkisel proteinler ve alglerden elde edilirler (Shu vd., 2017). Hastalıkla mücadelede ilaç kullanımını azaltıcı rol oynamaktadır (Wei vd., 2013). ACE-i peptitler Beyaz Peynir, Edam, Gouda, Cheddar, Camembert, Havarti, Festivo ve Blue peynirleri gibi farklı peynir çeşitlerinden ve ayrıca İtalyan, İspanyol, Meksika ve Fin peynirlerinden izole edilmiştir (Sülejmani vd., 2020; Garbowska vd., 2020).

ACE-i aktivitesi peynir olgunlaşması sırasında devam eden proteoliz, biyoaktif ve biyoaktif olmayan peptidlerle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Ong ve Shah, 2008). Üretimde kullanılan süt ürünlerinin çeşidi, uygulanan teknolojik işlemler ve proteolize dayalı suş seçiminin peynirdeki biyoaktif peptitlerin proteolitik aktivasyonu üzerine etkili olduklarında belirtilmiştir (Gupta vd., 2009).

Peynirlerin olgunlaşmasına katkıda bulunan bulamaçtan gelen *P. roqueforti* kaynaklı proteinazlar ACE-i aktivitesindeki artışa katkı sağlamıştır. Yapılan bir çalışmada *P. camemberti* ve *P. roqueforti* kaynaklı proteinazların, küfle olgunlaştırılmış peynirlerin olgunlaşmasına etkisinden dolayı İtalyan mavi damarlı bir peynir olan Gorgonzola peynirinde güçlü bir CN parçalanması gerçekleştiği ve bu parçalanmanın bir sonucu olarak

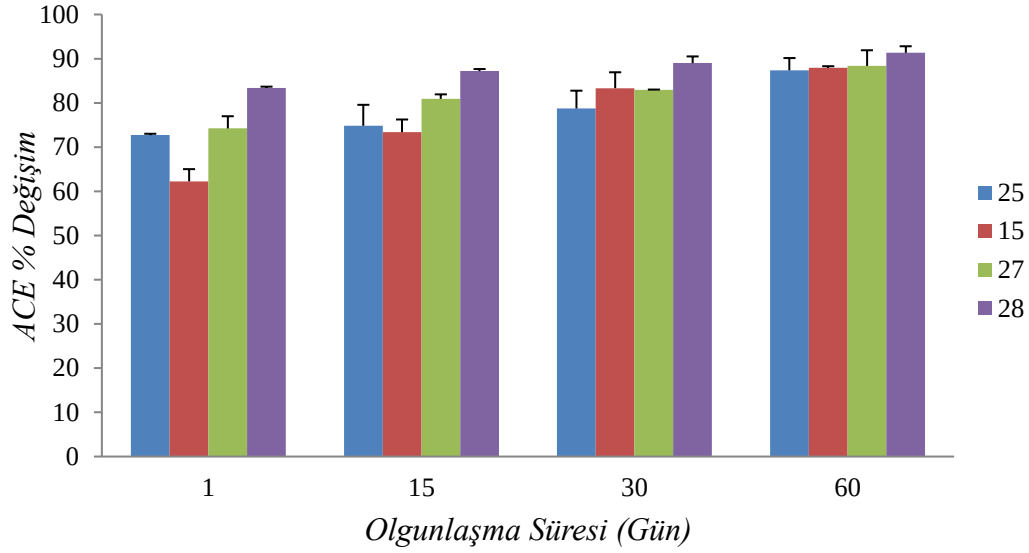
yüksek seviyede ACE-i peptit miktarı tespit edildiği bildirilmiştir (Stuknyte vd., 2015). Yapılan başka bir çalışmada Cheddar peyniri üretiminde uygulanan süt işleme tekniklerinin (sonikasyon, mikrodalga ve yüksek basınç uygulamaları) proteolitik enzimlerin proteolize olan duyarlılığına sağladığı katkının ACE-inhibe edici peptit oluşumuna da yansıdığı bildirilmiştir (Munir vd., 2020). ACE-i aktivite artışı peynirin depolama sıcaklığı ve süresinin yükseltilmesiyle sağlanabilmektedir (Sahingil vd., 2014). Depolama boyunca örneklerdeki ACE-i aktivitesi her örnek için artmış, 60. gün sonunda %87.37-%91.32 aralığına yükselmiştir.

Olgunlaşmanın ilk ayında örneklerin ACE-inhibitör aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak farklılık bulunurken ($P<0.05$), örneklerdeki proteoliz seviyesinin belli seviyelere ulaştığı 60. günde anlamlı bir fark olmamıştır ($P>0.05$). Düşük olgunlaşma sıcaklığının olumsuz etkisine rağmen, yüksek proteolitik performansına sahip Konya Küflü peynir bulamacı kullanımı peynir ACE-i aktivitesinde artışa katkı sağladığı gözlenmiştir. Hollanda tipi peynirlerde farklı *Lactococcus lactis* şuşlarının kullanıldığı bir çalışmada peynir örneklerinin 5 hafta sonunda ACE-i aktivitesi %80-95 aralığında bulunmuştur (Garbowska vd., 2020).

Proteoliz seviyesi belirli aşamalara ulaştığında, inhibitör aktivitesi olan peptitlerin inaktif forma dönüşmesi, ACE-inhibitör aktivitesinin durmasına ve azalmasına neden olacaktır. Bundan dolayı ACE-i aktivitesindeki artış, belirli bir düzeye kadar peynirdeki proteolizle ile açıklanabilmektedir (Koçak vd., 2020). Olgunlaşma sırasında proteoliz belirli bir seviyeyi aştığında biyoaktivite azalmaktadır (Pripp vd., 2006). Yapılan çalışmalar, orta derecede olgunlaştırılmış peynirlerin daha yüksek ACE-inhibitör aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Sieber vd., 2010). Örneğin orta derecede olgunlaştırılmış Gouda peynirindeki ACE-inhibitör aktivite değeri, daha uzun süre olgunlaştırılmış Gouda peyniri değerinin 2 katı olduğu tespit edilmiştir (Choi vd., 2012). ACE-inhibitör peptidlerin peynir olgunlaşması sırasında daha düşük aktiviteye sahip amino asitlere parçalanmasıyla aktivite değerinde azalma gerçekleşecektir (Gupta vd., 2013; Meira vd., 2012; Gonzalez-Gonzalez vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada farklı starter kültürler kullanılarak üretilen Manchego peynirinin ACE-i aktivitesi olgunlaşmanın ilk 4 ayında düşük olduğu, 8. ayda maksimum seviyeye ulaştığı ve olgunlaşma süresi 12 aya ulaştığında ise tekrar düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Gomez-Ruiz vd., 2002). Asiago d'alleva peynirinin 6 aylık numunelerinin, 12 ve 18 aylık peynirlere göre daha yüksek ACE inhibe edici aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Lignitto vd.,

2010). Parmesan peynirinde yapılan bir çalışmada ise olgunlaşmanın 6. ayında izole edilen α_{s-1} kazein kaynaklı antihipertansif peptidin, 15 ay olgunlaştırılmış peynirde bulunmadığı görülmüştür (Choi vd., 2012).



Şekil 4-26 Olgunlaşma süresince saptanan ACE-İnhibitör aktivite değerleri

Keçi sütü salamurla peynirlerinde yardımcı kültürlerin kullanıldığı çalışmada aktivite değerinin olgunlaşmanın 60. günü en yüksek seviyeye ulaştığı, devamında azalmaya başladığı bildirilmiştir (Koçak vd., 2020). Yine model peynirlerde farklı yardımcı kültürlerin kullanıldığı çalışmada en yüksek ACE-i aktivite değeri 60. gün ölçülmüş olup, ayrıca benzer örneklerin artan depolama sıcaklığına bağlı olarak yüksek aktivite değerleri gözlemlenmiştir (Sahingil vd., 2019). Olgunlaşma süresi boyunca örneklerin aktivite değerlerindeki değişime varyasyon kaynaklarının önemli etkisi bulunmaktadır ($P < 0.01$). (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Peynir örneklerinin ACE-İnhibitör aktivitesi varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	298.059	78.522	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	145.751	38.397	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	575.606	151.641	0.000
B*OS	15.105	3.979	0.004
S*OS	53.816	14.178	0.000

ACE-inhibitör peptitlerinin inhibisyon aktiviteleri temelde spesifik C-terminali sekansı ile belirlenmektedir. C-terminalinin inhibitör peptitlerin ACE'ye bağlanması için gerekli olan

bölge olduğu (Stuknyte vd., 2015) ve enzimin C-terminalinde hidrofobik aminoasit bulunan peptitleri substrat olarak tercih ettiği bildirilmiştir (Meisel, 1998; Fitz-Gerald ve Meisel, 2000). C-terminalinde Arg, Trp, Tyr, Phe, Lys veya Pro bulunan peptitler ACE'ye bağlanma ihtimali yüksek, inhibitör etkili peptitlerdir (Hernández-Ledesma vd., 2011). Moleküler ağırlığın da ACE inhibisyon etkisinde önemli bir özellik olduğu ve genel olarak ACE-inhibitör peptitlerinin hidrofobik aminoasit içeren kısa zincirli, düşük molekül ağırlığına sahip peptitler olduğu bildirilmektedir (Hayes ve Tiwari, 2015). Peynir örneklerinin kromatogramları hidrofobik peptit varlığı ve piklerinin daha çok olduğunu göstermektedir. Bu peptitler çok fonksiyonlu aktiviteye (ACE inhibitörü ve antioksidan aktivite) sahip içeriğinin bir sonucu olabilir. 4.3.2.4. bölümde yer alan örneklerin peptit kromatogramlarına bakıldığında özellikle 27 ve 28 nolu peynir örneklerinin ACE inhibitör aktivitesine sahip peptit sayısındaki farklılıklar olduğu söylenebilir. 4.3.2.3. bölümde amino asit kompozisyon miktarlarında yine hidrofobik amino asit varlığının fazla olmasının etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar muhtemel hidrofobik amino asitlerin ACE inhibitörlerinin yapısında önemli bir rol oynadığını doğrulamıştır.

4.3.5. Peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktive ölçümü

Konya küflü peynirinden gelen ikincil floranın aminopeptidaz aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı bu analizde leucine *p*-nitroaniline (Leu-*p*NA) substrat kullanılmıştır. Olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerine ait ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm değerleri Çizelge 4.20 ve Şekil 4.27'de verilmiştir. Çizelge 4.21'de ise varyasyon kaynaklarının aminopeptidaz aktivitesi üzerine etkili oldukları görülmektedir.

Çizelge 4.20 Model peynir örneklerine ait aminopeptidaz aktivite değerleri (OD/g saat)

	Günler	25	15	27	28
PepN	1	0.124 a.A	0.098 b.A	0.102 bc.A	0.105 c.A
	15	0.102 a.B	0.104 a.A	0.140 b.C	0.187 c.C
	30	0.096 a.C	0.101 ab.A	0.107 b.AB	0.123 c.B
	60	0.107 a.D	0.122 b.B	0.114 ab.B	0.116 ab.AB

a. b. c. : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A.B.C.D : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

OD: Optik yoğunluk (410 nm'de)

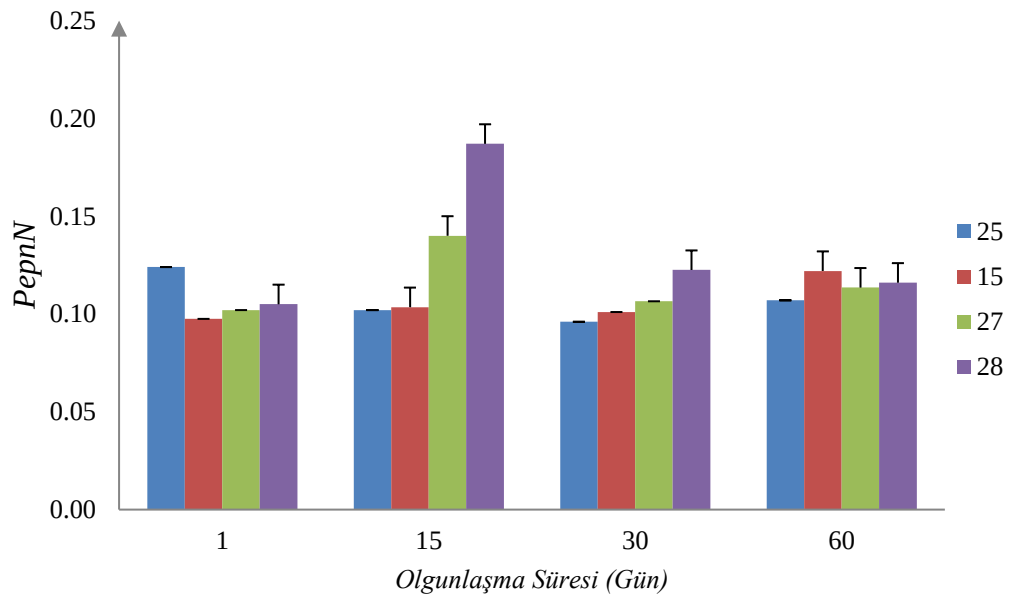
Olgunlaşmanın 1. ve 15. günlerinde 27 ve 28 nolu peynirlerde aminopeptidaz enzim aktivitesinde önemli derecede katkı sağlamıştır ($P<0.05$). Düşük depolama sıcaklığındaki

15 nolu örnek kontrol örneği depolama boyunca artan bir aktivite göstermiştir. Örneklerin enzim aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresi ile ilave bulamaç miktarının etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmaktadır ($P<0.01$). Bulamaç varlığı peynir örneklerinin enzim aktivite değerine olumlu etki göstermiştir. Ancak düşük sıcaklıkta uzun, yüksek sıcaklıkta ise daha kısa sürede etkisini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.21 Peynir örneklerinin enzim aktive ölçüm varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	KO	F	P
Bulamaç Oranı (B)	0.003	62.188	0.000
Depolama Sıcaklığı (S)	0.001	16.750	0.000
Olgunlaşma Süresi (OS)	0.002	36.611	0.000
B*OS	0.002	45.931	0.000
S*OS	0.001	16.920	0.000

Süt protein kazeininden; peynir mayası ve proteolitik enzimlerin uyumlu etkisiyle salınan peptitler ve amino asitler, olgunlaşması sırasında doğrudan veya öncül olarak lezzet gelişimine katkı sağlarlar (Baankreis, 1991). Hücre dışına bağlı extracellular proteinazlar kazein harici proteinler üzerine etkileri varken, aminopeptidazları içeren hücre içi peptidazların serbest amino asitlerin oluşturduğu peynir aroması üzerine etkilidirler. *Penicillium* proteolitik sisteminden kaynaklı küfle olgunlaşmış peynirlerde aminopeptidaz aktivitesi yüksektir. Peynirlerdeki yüksek nem, pH ve küflerin varlığından dolayı *Penicillium* varlığının etkisi gözlemlenir (Castro and Hernandez, 1994).



Şekil 4-27 Olgunlaşma süresince saptanan aminopeptidaz aktivite değerleri

Peynirin acılığını düşürdüğü bilinen aminopeptidaz sisteminin ikincil bir floranın katkısı ile daha da artış göstermektedir. Ayrıca termofilik laktik asit bakterileri, mezofilik laktik asit bakterilerine göre daha fazla aminopeptidaz sistemine sahip olduklarından peynir teknolojisinde spesifik mikroorganizmalardaki aminopeptidaz sistemi birkaç kez çalışılmıştır. (Cercing vd., 1987; Kamaly and Marth, 1989; Dako vd., 1995). Yapılan bir çalışmada Cheddar peynirinin olgunlaşmasını hızlandırmak amacıyla ilave edilen *L. rhamnosus*'un rekombinant aminopeptidazı kullanımı birincil proteoliz seviyesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmazken, artan enzim konsantrasyon ilavesi ile daha fazla ikincil proteolize yol açtığını göstermiştir (Azarnia vd., 2011). Bu nedenle Konya küflü peynirinden kaynaklı sekonder florasının (*P. roqueforti*) model peynirlerdeki aminopeptidaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Mezofilik laktik asit (yarı sert koyun peyniri, Roncal, Gouda ve Mahon), termofilik laktik asit (İtalyan ve İsveç tipi: Provolonc, Fontina, Parmiggiano-Reggiano, Appenlenzer, Comte ve Beaufort) ve küfle olgunlaştırılan peynirler (Brie, Camembert, Roquefort, Cabrales ve Danish Blue) olmak üzere 3 ayrı gruplandırma üzerinden peynir örneklerinde aminopeptidazın polipeptid zincirini NH₂ ucundan başlayarak parçalamasından yola çıkılarak aminopeptidaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Mezofilik laktik asit ile olgunlaştırılan peynirlerden Roncal peynirinin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve protein olmayan azot (NPN) ve amino nitrojen (N.NH₂)'nin toplam azota (NPN/TN ve N.NH₂/TN) oranlarının diğerlerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yaklaşık 15 gün kısa bir olgunlaştırma sonrası satışa sunulan Mahon peyniri ise en düşük aktivite değerini vermiştir. İtalyan ve İsveç tipi peynirlerden Appenlenzer ve Parmiggiano-Reggiano peynirlerinin aktivite değerlerinin yüksek olduğu, bu peynirlerde de NPN/TN oranlarının yüksek olduğu belirtilmiştir. Küfle olgunlaştırılan peynirlerde Danish Blue peynirinin yüksek aktivite gösterdiği ve bu peynirde ise NPN'nin kazein olmayan azota (NPN/NCN) ve N.NH₂/TN oranlarının yüksek olduğunu bildirmiştir. Yüzeyden küfle olgunlaştırılan peynirler (Brie ve Camembert) küfle olgunlaştırılan peynirlere göre daha düşük aktivite göstermiştir. Sebebinin ise yüzeyden olgunlaştırılan peynirlerin düşük olgunlaşma indeksine sahip olması ve yapılan analizlerde peynirin iç kısımları kullanılması olarak açıklanmıştır (Castro ve Hernandez, 1994).

Enzimlerin aktif oldukları pH koşulları açısından bakıldığında en yüksek aktivite değerininin beklendiği 27 ve 28 nolu örneğin en düşük pH değerine sahip olduğu 15. gün en yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Bir çalışmada inek, koyun ve keçi sütleri (4:4:2)

karışımından yapılan peynirin üretiminde 1 kg'ına 10 g toz halinde beş farklı deniz yosunu kullanılmış ve yosundan gelen peptidazlardan aktivitesi araştırılmıştır. Aminopeptidaz aktivitesinin ölçülmesi için substrat olarak Leu-*p*NA ve Lys-*p*NA kullanıldığını ve aktivitenin her iki substrat içinde olgunlaşma boyunca bütün peynir örneklerinde azaldığını belirtmişlerdir. Bunun muhtemel sebebinin olgunlaşma boyunca peynirlerin artan pH değerlerine bağlı olarak enzimin inaktif olduğunu bildirmişlerdir (del Olmo vd., 2018).

Başka bir çalışmada aminopeptidaz enzim aktivitesi yarı sert keçi peynirinde 0.017 OD/g saat olarak ölçülmüştür (Gomez vd., 1988). Yarı sert koyun peynirinin 1, 30, 45, 60, 90 ve 180. olgunlaşma günlerinde yapılan aminopeptidaz enzim aktivite ölçümlerinde aktivite değerinin 1. gün 0.03 seviyelerinden 45. güne kadar artarak 0.06 seviyelerine geldiği, 60. gün tekrar 0.03 seviyelerine indiği, daha sonra tekrar yükselme eğilimi göstererek 90. gün 0.046 ve 180. gün ise 0.212 olarak ölçülmüştür. İlk 3 aylık olgunlaşma süresi boyunca kaydedilen düşük enzim aktivitesi seviyesi temel olarak laktokokların etkisine bağlı olabileceği (Requena vd., 1993), mikroflorada 3-4 aya kadar laktobasillerin artışı ve laktokokların kademeli azalma gerçekleştiği, olgunlaşmanın 6. ayındaki aktivitenin muhtemelen laktokok ve laktobasillerin hücre parçalanmalarını takiben hücre içi enzimlerin salınmasından kaynaklanabileceği ve yarı sert koyun peynirinin olgunlaşmasında *Lactobacillus casei* kültürünün *Lactococcus lactis*'e göre Leu-*p*NA substratı üzerinde 25-30 kat etkili olduğuna değinilmiştir (Castro ve Hernandez, 1994).

4.3.6. Renk analizi

Renk ölçümü hammaddelerin ve teknolojik süreçlerin numuneyi nasıl etkilediğini öğrenmek, son ürünün kalitesini değerlendirmek ve depolama süresince ürünlerdeki değişiklikleri gözlemlemek için önemlidir (Chudy ve Gierałtowska, 2020). Peynirlerin spektrokolorimetrik ($L^*a^*b^*$) ölçüm tekniği ile olgunlaşma süreci ve kalite kontrol takibi yapılabilmektedir. Mavi damarlı peynirlerde koyu mavi damar rengi genelde kuvvetli bir aroma ile ilişkilendirilirken, maviden kahverengiye doğru bir renk değişikliği genellikle aşırı olgunlaşmayı veya hatta kusurlu bir peynir olduğunun göstergesi olduğu düşünülmektedir (Fairclough vd., 2011). Spektrokolorimetri tekniği bazı peynir ürünlerinde olgunlaşma süreci ile ilişkilendirilmesinde başarıyla uygulanmıştır (Dufosse vd., 2005).

Çizelge 4.22 Model peynir örneklerine ait renk analizi değerleri

	Günler	25	15	27	28
L^*	1	87.96±0.29 ^{a.A}	87.22±0.35 ^{b.A}	87.36±0.59 ^{b.A}	87.17±0.71 ^{b.A}
	15	86.48±1.04 ^{a.B}	86.76±0.63 ^{a.A}	82.60±0.78 ^{b.B}	84.98±0.56 ^{c.B}
	30	83.15±1.86 ^{a.C}	83.50±2.83 ^{a.B}	80.09±1.78 ^{b.C}	81.99±2.56 ^{ab.C}
	60	81.59±1.93 ^{a.D}	80.82±1.26 ^{a.C}	80.61±1.42 ^{a.C}	80.11±2.90 ^{a.C}
a^*	1	-1.00±0.07 ^{a.A}	-1.13±0.11 ^{b.A}	-1.00±0.06 ^{a.AB}	-1.01±0.10 ^{a.A}
	15	-0.83±0.14 ^{a.B}	-0.96±0.11 ^{b.B}	-1.09±0.10 ^{c.A}	-1.02±0.06 ^{bc.A}
	30	-0.84±0.10 ^{a.B}	-0.89±0.14 ^{a.B}	-0.86±0.13 ^{a.C}	-0.90±0.11 ^{a.B}
	60	-0.69±0.15 ^{a.C}	-0.94±0.06 ^{b.B}	-0.91±0.13 ^{b.BC}	-1.06±0.07 ^{c.A}
b^*	1	5.87±0.40 ^{a.A}	6.14±0.36 ^{ab.A}	6.21±0.36 ^{ab.A}	6.29±0.30 ^{b.A}
	15	6.37±0.47 ^{a.AB}	6.12±0.45 ^{a.A}	6.68±0.42 ^{a.B}	6.13±0.66 ^{a.A}
	30	6.64±0.53 ^{a.B}	6.54±0.67 ^{a.A}	6.99±0.22 ^{a.B}	6.92±0.25 ^{a.B}
	60	6.32±0.48 ^{a.AB}	6.34±0.41 ^{a.A}	6.85±0.39 ^{ab.B}	7.30±0.68 ^{b.B}

^{a, b, c} : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C} : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

Çizelge 4.22’de model peynirlerin olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde iç ve dış yüzeylerinden ikişer defa olmak üzere dört ölçüm alınmak suretiyle hesaplanan L^* , a^* ve b^* değerleri verilmiştir. Duyusal değerlendirme kısmında panelistlerin renk puanlamaları ile de anlaşılacağı üzere gözle tespit edilen farklılıklar vardır. Varyasyon kaynaklarının renk parametreleri üzerine istatistiksel açıdan etkileri bulunurken sadece olgunlaşma sıcaklığının a^* renk parametresine etki etmemiştir (Çizelge 4.23) ($P<0.01$).

Çizelge 4.23 Peynir örneklerinin renk parametreleri varyans analiz sonuçları

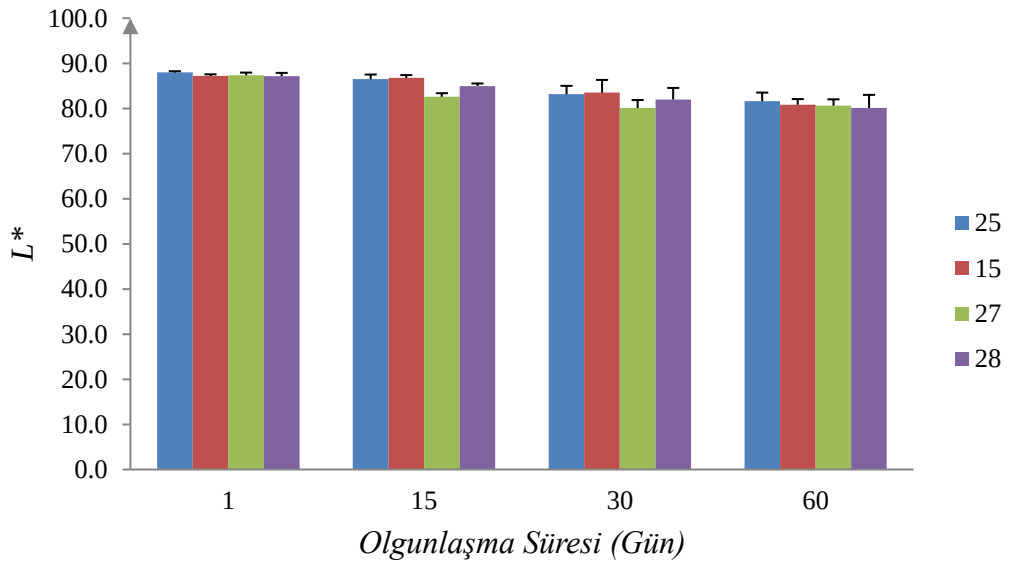
Varyasyon Kaynakları	L^*		a^*		b^*	
	F	P	F	P	F	P
Bulamaç Oranı (B)	14.453	0.000	20.599	0.000	6.942	0.001
Depolama Sıcaklığı (S)	23.106	0.000	0.348	0.556	11.947	0.001
Olgunlaşma Süresi (OS)	97.826	0.000	15.322	0.000	11.515	0.000
B*OS	2.496	0.026	6.329	0.000	2.748	0.016
S*OS	7.538	0.000	3.847	0.011	0.905	0.441

L^* parametresi renk ölçüm sisteminde aydınlık olarak ifade edilmekte ve 0 siyah-100 beyaz renge karşılık gelmektedir. Pozitif a^* değerleri kırmızılığı, negatif a^* değerleri yeşilliği ifade ederken pozitif b^* değerleri sarılığı, negatif b^* değerleri maviliği göstermektedir L^* değeri 0’den 100’e kadar olan sayılarla, a^* ve b^* değeri ise 0’den 60’a kadar olan sayılarla ifade

edilir. Değerin büyük çıkması ifade ettiği renge yakınlığını göstermektedir (Üren, 1999; Yetim, 2001). Bulamaç ilaveli peynir örneklerinin renk parametrelerinden L^* ve a^* değerleri olgunlaşmanın ilk ayında *P. roqueforti* kültürü ile üretilen İspanyol Valdeon peynirinin renk parametreleri ile benzerlik göstermiştir. Valdeon peynirindeki a^* değerindeki belirgin azalmanın ise *P. roqueforti*'nin çimlenmesine ve büyümesine karşılık gelen bir aydan sonra gerçekleştiği görülmüştür (Diezhandino vd., 2016).

Peynirlerde renk; kullanılan süt tipi, hayvanların beslenme farklılıkları, mevsimsel sapmalar dolayısıyla β -karoten ve laktoflavin miktarının farklılık göstermesi, peynirin yağ içeriği ve olgunlaşma derecesinin etkili olduğu bildirilmiştir (Üçüncü, 2004).

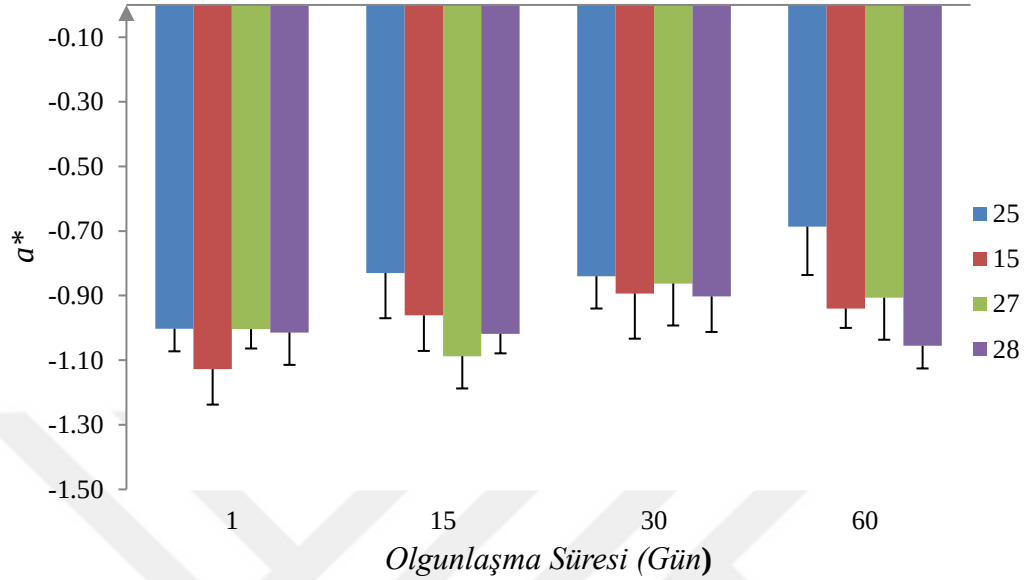
L^* aydınlık değeri en yüksek peynir olgunlaşmanın her döneminde kontrol örneği iken 27 ve 28 nolu örneklerde en düşük aydınlık değerlerine sahip olmuşlardır. 15 nolu örnek kontrol örneği ile yakın aydınlık değerleri göstermiştir. Şekil 4.28'de anlaşılabacağı üzere olgunlaşmanın ilerlemesi ile peynir örneklerinde L^* aydınlık değerleri azalma eğilimindedir. Olgunlaşma boyunca meydana gelen proteoliz ile kazeinlerin çözünür forma geçmesi peynirde beyazlıkta azalmaya neden olmaktadır (Chudy vd., 2020). 60. gün aydınlık değerleri önemli bulunmazken ($P>0.05$), depolamanın 1, 15 ve 30. günlerdeki aydınlık değerlerinde istatistiksel açıdan farklılıklar arz etmiştir ($P<0.05$).



Şekil 4-28 Olgunlaşma süresince saptanan L^* aydınlık değerleri

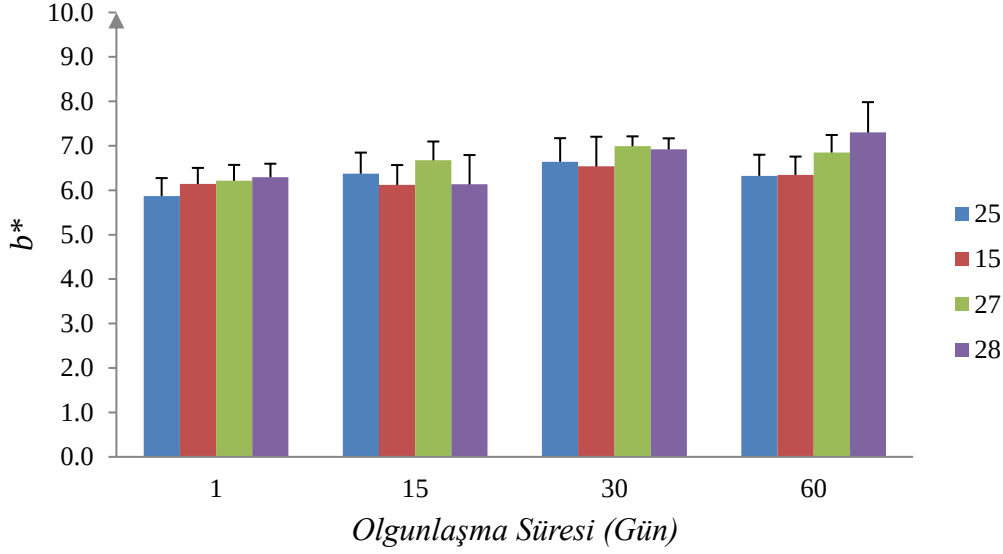
a^* değeri bütün peynir örneklerinde negatif değerdedir (Şekil 4.29) ve depolama sıcaklık farkının etkisi olmamıştır. Kontrol örneğinde a^* değerinde olgunlaşmanın ilerlemesi ile artış gözlenmiştir. Olgunlaşmanın ilk gününde en düşük depolama sıcaklığında muhafaza edilen

15 nolu peynir örneği en düşük a^* değeri ile diğer peynir örnekleri arasında anlamlı farklılık vardır ($P<0.05$). 15. ve 60. günler hariç olgunlaşmanın 30. günü peynir örneklerindeki a^* değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 4-29 Olgunlaşma süresince saptanan a^* (yeşil ton) değerleri

b^* değeri bütün peynir örneklerinde genel olarak olgunlaşmanın ilerlemesi ile artış gözlenmiştir (Şekil 4.30). Çiğ, pastörize ve yüksek basınçla işlenmiş keçi sütünden yapılan peynirlerde olgunlaşma süresinin b^* değerleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Buffa vd., 2001). Kontrol örneği olan 25 ve 15 nolu peynirler benzer b^* değerlerine sahiptirler. 27 ve 28 nolu örnekler ise daha yüksek b^* değerlerine ulaşmıştır. İstatistiksel bakımdan incelendiğinde sadece olgunlaşmanın 60. günündeki değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($P<0.05$).



Şekil 4-30 Olgunlaşma süresince saptanan b^* (sarı ton) değerleri

4.3.7. Maya ve küf sayımı

Model peynir üretiminde Konya küflü peynir bulamacının kullanımı ile maya-küf değerlerindeki değişim gözlemek amacıyla yapılan mikrobiyolojik analize ait tespit edilen değerler Çizelge 4.24’de ve bu değerlerin oluşturduğu grafik Şekil 4.31’de verilmiştir.

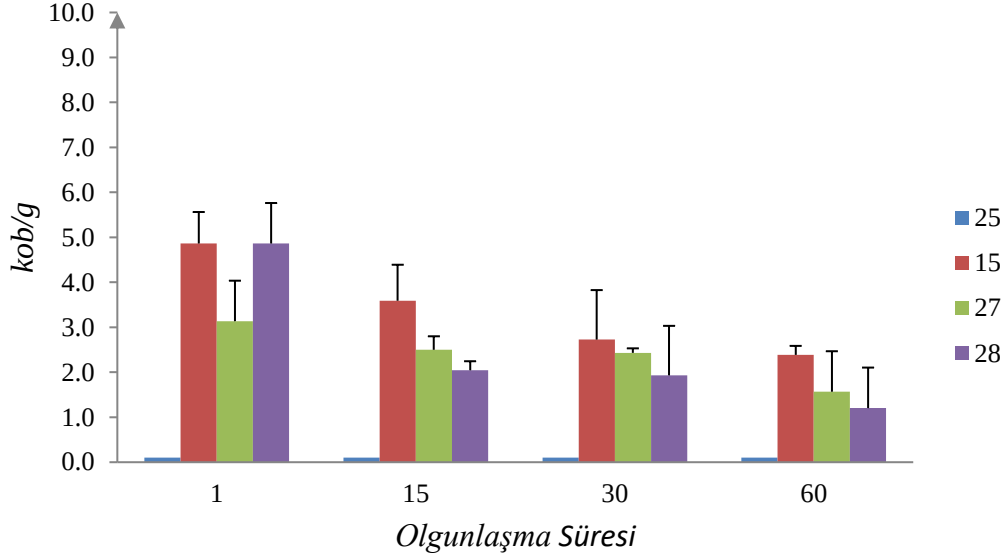
Çizelge 4.24 Model peynir örneklerine ait maya ve küf sayım değerleri

Günler		25	15	27	28
Maya ve Küf	1	T.E. a.A	4.9±0.7 c.A	3.1±0.9 b.A	4.9±0.9 c.A
	15	T.E. a.A	3.6±0.8 c.B	2.5±0.3 b.AB	2.0±0.2 b.B
	30	T.E. a.A	2.7±1.1 b.B	2.4±0.1 b.AB	1.9±1.1 b.B
	60	T.E. a.A	2.4±0.2 c.B	1.6±0.9 bc.B	1.2±0.9 b.B

a, b, c : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A,B : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde gelişen maya-küf sayısına bakıldığında kontrol peynirinde tespit edilmediği, diğer bulamaç ilaveli peynirlerde olgunlaşmanın 1. gününde 3.1-4.9 kob/g arasındadır. Bununda Konya küflü peyniri üretiminde kullanılan *Penicillium roqueforti* kültüründen kaynaklanmaktadır.



Şekil 4-31 Olgunlaşma süresince saptanan maya-küf sayım (kob/g) değerleri

Olgunlaşma ile beraber Konya küflü peynir bulamacı ilaveli peynirlerde *Penicillium roqueforti* azalmakla beraber varlığında koruduğu görülmüştür ($P<0.05$). Peynirlerdeki olgunlaşma hızına bağlı olarak maya ve küf sayısındaki azalma eğiliminde oldukları görülmüştür. Maya ve küf sayısı olgunlaşma süresince azalmakta ve ancak varlığının devam ettirdikleri konusunda bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Gerasi vd., 2003; Guizani vd., 2006).

4.3.8. GC-MS ile uçucu bileşiklerin belirlenmesi

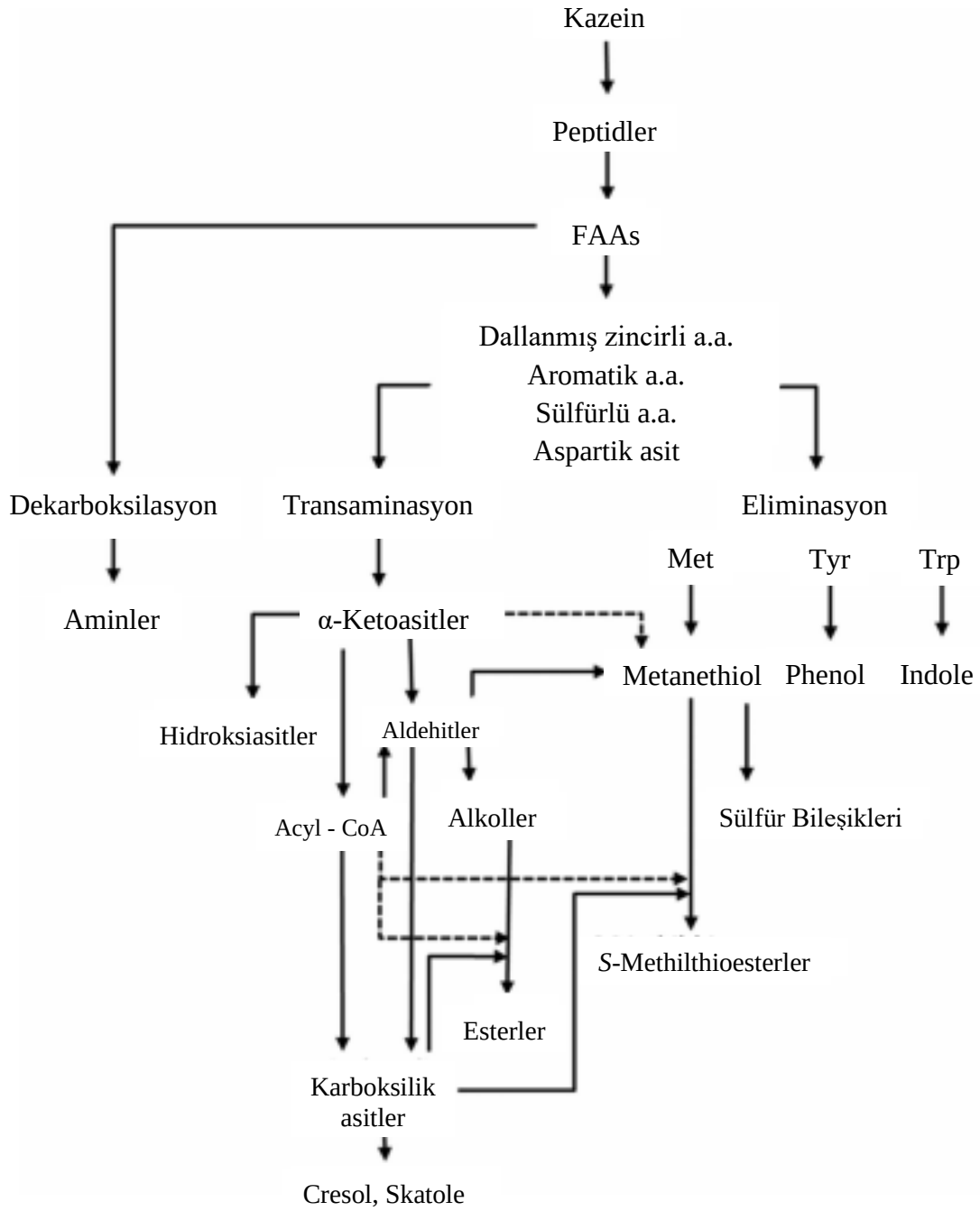
Olgunlaşma süresince peynirlerin uçucu bileşikler profilinde meydana gelen değişimler. GC-MS tekniği ile belirlenmiştir. Model peynir örneklerinde 1, 15, 30 ve 60. günlerde uçucu bileşenlerinin belirlenmesine yönelik yapılan analiz sonucunda alkoller (23), aldehitler (3), ketonlar (13), esterler (29), asitler (11), terpen (4) ve çeşitli bileşikler (18) olmak üzere toplam 101 uçucu bileşiği belirlenmiştir. Uçucu bileşikler profiline ait değerler Çizelge 4.25-31’de verilmiştir.

Pek çok peynir çeşidi karakteristik lezzet (tat, tekstür ve aroma) ve yapısının gelişimi için olgunlaşma periyoduna ihtiyaç duymaktadır (Alewijn vd., 2005). Peynirin olgunlaşma boyunca çeşidine karakteristik aroma özelliği veren karmaşık ve dinamik biyokimyasal mekanizmalar gerçekleşir (McSweeney, 2004). Meydana gelen değişiklikler iki genel bölüme ayrılarak incelenebilmektedir. Birincil değişiklikler (lipoliz, proteoliz ve laktoz, laktat ve sitrat metabolizması ‘glikoliz’) olarak adlandırılan birinci bölüm laktik asit, yağ asitleri ve serbest aminoasitlerin değişikliklerini içermektedir. Birincil

değişikliklerde, kazein peptitler ve amino asitlere dönüşür; laktik asit ve diğer fermentasyon ürünleri laktozun parçalanmasıyla oluşurken süt yağı yağ asitlerine hidrolize olmaktadır (El Soda, 1995). İkincil (yağ asitleri ve aminoasitler metabolizması) değişiklikler olarak isimlendirilen ikinci bölüm ise birincil bileşikler üzerine enzimlerin etki etmesi ile meydana gelen bileşiklerin oluşumunu gerçekleştirir (Hayaloglu vd., 2006). İkincil değişikliklerde ise aminoasitlerden aminler, aldehitler, sülfür bileşikleri ile CO₂ oluşmakta, laktik asit organik asitlere ve CO₂'e dönüşürken yağ asitleri ise ikincil alkollere parçalanmaktadır (Sing vd., 2003).

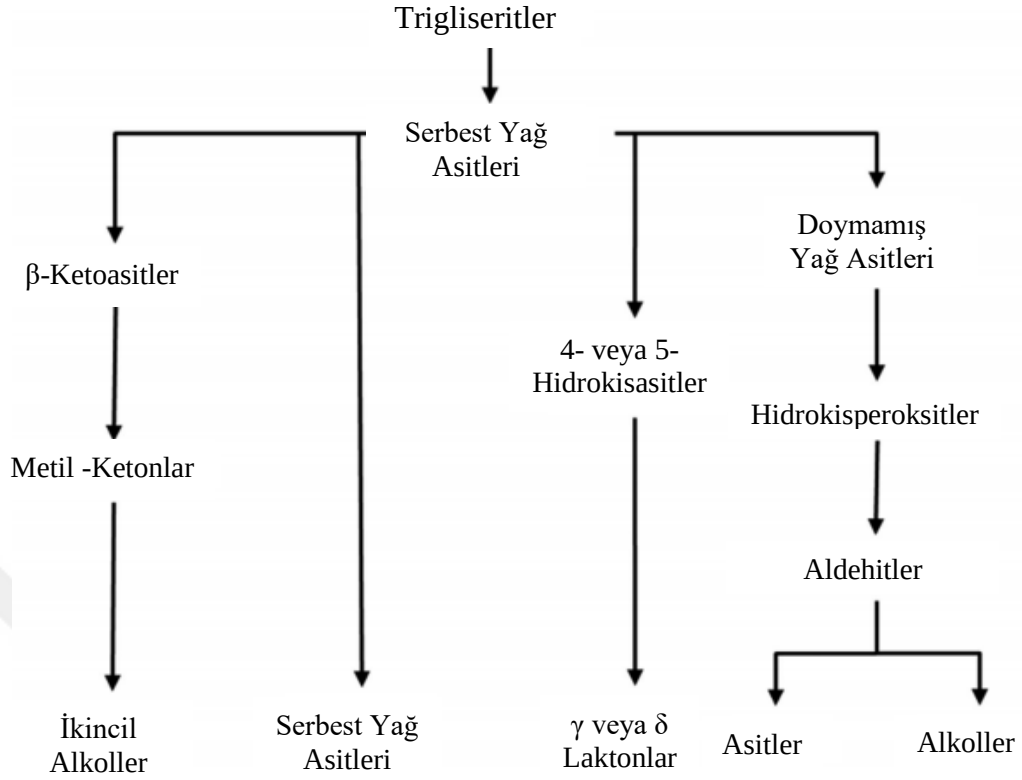
Kısaca sütün önemli bileşenleri olan kazeinler, süt lipidleri ve laktoz bu birincil ve ikincil biyokimyasal olaylar zincirinin oluşturdukları ürünler ve birbirleriyle etkileşimi sonucu peynir çeşidine özgü uçucu bileşiklerine dönüşmektedirler. İkincil reaksiyonlar olan serbest amino asitler katabolizması (Şekil 4.32) (Yvon ve Rijnen, 2001) ve serbest yağ asitleri katabolizması (Şekil 4.33) (McSweeney ve Sousa, 2000) peynir çeşidinin karakteristik aromasının oluşması için daha fazla önem taşımaktadırlar.

Şekil 4.34 ile peynir örneklerine ait olgunlaşma süresi boyunca oluşan uçucu bileşik miktarları ile Şekil 4.35'de uçucu bileşik çeşitlerinin toplam uçucu bileşikleri içerisinde % dağılımı verilmiştir. Peynir olgunlaşmasına sürecine, dolaylı olarak proteoliz seviyesine etkisi olan Konya küflü peynir bulamacının uçucu bileşikler üzerindeki etkisi incelendiğinde de farklı bileşikler ve miktarlarına etkisinin olduğu görülmektedir. Bunun ise yüzeyi küfle olgunlaştırılan Konya küflü peynir örneği bulamacı ile model peynir bileşiminde yer alan proteolitik enzim varlığı ve ileri lipoliz seviyesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Olgunlaşma boyunca gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar peynir aromasına katkıda bulunan birçok uçucu organik bileşik üretirler (Matera vd., 2018). Saptanan uçucu bileşikler ve/veya bileşik miktarları bakımından bulamaç ilaveli peynir örneklerindeki alkol, asit, keton ve esterlere ait sonuçlar ile yüzeyden olgunlaştırılan peynirlerin birkaçına ait sonuçları (Bertuzzi vd., 2018) ile özellikle Camembert peyniri (Molimard ve Spinnler, 1996) uçucu bileşikler profili ile benzerlik göstermiştir.



Şekil 4-32 Peynirlerdeki serbest amino asitlerin katabolizması genel izlenimi

Serbest amino asitlerin katabolizmasının ürünleri aldehitler, alkoller, karboksilik asitler, aminler ve sülfür bileşikleridir (Ganesan ve Weimer, 2017; Kilcawley, 2017).



Şekil 4-33 Peynirlerdeki serbest yağ asitlerin katabolizması genel izlenimi

Serbest yağ asitleri sadece peynirin lezzetine doğrudan etkili olmayıp, aynı zamanda dolaylı olarak metil ketonların, ikincil alkoller, düz zincirli aldehitler, laktonlar, esterler ve S-thioesterlerin oluşumunda rol oynarlar (Collins vd., 2003a; Smit vd., 2005; Thierry vd., 2017).

4.3.8.1. Alkoller

Peynirde alkoller; laktoz metabolizması, metil ketonların indirgenmesi, amino asit metabolizması ve linoleik veya linolenik asidin parçalanması gibi farklı metabolik yollarla oluşabilmektedir (Collins vd., 2003b). Genel olarak peynirde, karbonhidrat metabolizması sonucu primer alkoller, amino asit metabolizması ile dallanmış zincirli alkoller ve aromatik alkoller, yağ asitleri katabolizması ile de sekonder ve doymamış alkoller meydana gelmektedir (Hayaloğlu vd., 2011b).

Birincil ve ikincil alkoller ile ketonlar yuşak ve küflü peynirlerin önemli uçucu bileşiklerindendir (Molimard ve Spinnler, 1996). Depolama süresi boyunca peynir örneklerinde alkol miktarında artış olmuştur. Konya küflü peynir bulamacı ilavesinin peynir örneklerindeki ileri metabolik olaylardan dolayı alkol miktarı kontrol örneği olan 25 nolu

örneğe göre daha fazla miktardadır. Ethanol, İzopropil alkol, 2-propanol-1-ol, 2-heptanol, 2-octanol ve nonan-2-ol oluşumundaki farklılık belirgindir (Çizelge 4.15). Peynirlerde birincil alkol ethanol (dry dust. alkol), 1-propanol (tatlı şarap) ve 3-metil butanol (taze peynir, nefes kesici alkol, meyve ve tahılsı) iken ikincil alkol ise 2-bütanol (tatlı şarap) en yaygın tespit edilen alkol bileşikleridir (Kilcawley, 2017).

Küfle olgunlaştırılan Civil peyniri ve Blue peynirlerinde 2-bütanol, 2-pentanol, 2-heptanol ve 2-nonanol ikincil alkoller tipik uçucu bileşiklerdir (Molimard ve Spinnler, 1996; Moio vd., 2000; Curioni ve Bosset 2002; Cakmakçı vd., 2013). İkincil bir alkol olan 2-heptanol, *P. roqueforti* metabolizması ile metil ketonların enzimatik olarak indirgenmesiyle oluşur (Cantor vd., 2004).

Dört karbonlu alkollerden biri olan 2,3-bütandiol fermente süt ürünlerinde düşük konsantrasyonlarda bulunabilir ve sitrat metabolizması sonucu oluşan önemli uçucu bileşiklerinden biridir (McSweeney ve Sousa, 2000).

Kontrol peynir örneğinde tespit edilemeyen 7-octen-2-ol uçucu bileşiği Konya küflü bulamaç katkısından dolayı olduğu ve olgunlaşma ile miktarında belli bir artma olduğu görülmüştür. Ülkemizdeki on bir farklı peynir örneğindeki alkol uçucu bileşiklerine bakıldığında sadece Civil peynirinde 7-octen-2-ol bileşiğinin tespit edilmiştir (Hayaloglu ve Karabulut, 2013). Bu benzerliğin Konya küflü peyniri ve Civil peynirlerinin *P. roqueforti* kültürü kullanılarak yüzeyi küfle olgunlaştırılan peynir olmaları olarak yorumlanabilir.

Çizelge 4.25 Model peynir örneklerinde saptanan alkoller µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
917	Isopropyl alcohol	0.069	0.155	0.118	0.163	0.079	0.353	0.583	0.678	0.223	0.425	0.647	1.197	0.246	1.211	1.815	14.209
925	Ethanol	1.445	0.191	7.31	3.948	19.629	6.455	31.492	29.652	22.464	21.044	57.908	36.345	22.25	44.868	19.202	30.535
1018	2-Butanol	T.E.	T.E.	0.122	0.305	1.037	T.E.	57.399	46.559	6.533	20.054	57.022	38.009	19.269	24.405	26.565	107.132
1090	Isobutyl alcohol	T.E.	T.E.	0.134	0.158	0.607	0.066	0.175	0.246	0.823	0.051	0.37	0.211	0.112	T.E.	0.058	0.17
1115	2-Propen-1-ol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.688	1.531	0.121	0.193	0.527	1.031	0.117	0.949	0.859	4.037
1121	2-Pentanol	4.03	1.407	1.309	5.038	T.E.	1.472	0.73	1.638	T.E.	2.128	T.E.	T.E.	T.E.	2.059	T.E.	T.E.
1145	1-Butanol	0.327	0.164	0.719	1.317	0.176	T.E.	2.205	4.239	1.275	0.203	6.024	6.909	T.E.	30.59	T.E.	T.E.
1206	3-Methyl-1-butanol	12.239	3.934	16.015	12.45	60.314	11.482	30.364	18.21	69.358	6.45	36.257	21.689	69.461	20.436	32.667	T.E.
1247	1-Pentanol	T.E.	4.94	3.963	5.561	T.E.	3.847	1.261	1.444	T.E.	1.658	1.511	1.282	2.265	0.966	T.E.	T.E.
1313	2-Heptanol	T.E.	4.255	7.125	14.829	0.147	20.213	19.843	21.106	0.258	17.435	21.597	23.535	0.492	17.212	5.095	32.915
1327	3-Methyl-2-buten-1-ol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.124	T.E.	T.E.	T.E.	0.201	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1347	1-Hexanol	1.545	T.E.	1.113	0.818	0.948	0.621	2.044	1.883	1.299	1.146	2.418	3.531	2.35	2.059	4.187	4.163
1411	2-Octanol	T.E.	T.E.	0.051	0.147	T.E.	0.246	0.545	0.624	T.E.	0.498	0.805	0.627	T.E.	0.505	0.179	1.093
1448	1-Heptanol	0.355	1.105	1.415	1.815	T.E.	1.899	0.461	0.641	2.072	1.535	1.596	0.473	0.019	1.111	0.565	1.437
1481	2-Ethylhexanol	0.505	0.502	1.164	T.E.	0.454	0.243	0.657	0.512	0.169	0.463	T.E.	0.458	0.156	0.379	0.065	0.63j6
1503	6-Hepten-1-ol	T.E.	0.295	0.23	0.333	T.E.	0.257	0.282	0.23	T.E.	0.196	T.E.	0.196	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1510	Nonan-2-ol	T.E.	0.964	1.642	3.350	0.276	4.256	18.232	17.451	0.310	14.073	17.878	17.438	0.356	17.843	15.835	23.762

Çizelge 4.25 (devamı)

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
1550	1-Octanol	0.119	0.066	0.115	0.103	0.842	0.101	0.959	0.536	0.491	0.120	0.537	0.326	0.113	0.171	0.375	1.667
1563	7-Octen-2-ol	T.E.	0.432	0.590	1.309	T.E.	2.337	5.876	5.719	T.E.	4.744	9.527	5.739	T.E.	3.500	T.E.	1.752
1574	2,3-Butanediol	T.E.	T.E.	0.213	0.391	13.017	T.E.	1.478	0.838	5.618	T.E.	0.307	0.353	T.E.	T.E.	0.223	0.606
1610	2-Decanol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	109.390	192.181	T.E.	T.E.
1652	1-Nonanol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.206	0.129	T.E.	0.083	0.216	0.155	T.E.	T.E.	0.288	0.317
1709	2-Tridecanol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.720	0.562	T.E.	0.453	1.513	0.600	T.E.	0.574	0.854	1.568

4.3.8.2. Aldehitler

Aldehitler; çoğunlukla serbest amino asitlerin dekarboksilasyon. deaminasyon. transaminasyon ile Strecker reaksiyonları sonucunda oluşmakta, aynı zamanda düz zincirli aldehitlerde olduğu gibi doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile de meydana gelmektedir (Fox ve Wallace 1997; Massouras vd., 2006). Düz zincirli aldehit bileşiklerinin (1-heksenal, 1-oktanal, 1-nonanal ve 1-dekanal) peynirin olgunlaşması esnasında hızlı bir şekilde alkol ve asitlere dönüştüğü ve bu nedenle algılanabilir peynir aromasına düşük katkı sağladıkları bildirilmektedir (Irigoyen vd., 2007; Akalin ve Karaman, 2011; Atasoy vd., 2013; Ocak vd., 2015; Mei vd., 2015). Dallanmış aldehit bileşiklerinin (2-metil-butanal. 3-metil-butanal) ise mikroorganizmaların enzimatik aktiviteleri sonucunda serbest amino asitlerden oluştuğu ve yeşil çimen/otsu aroma ile karakterize edildiği bildirilmiştir (Ortigosa vd., 2005; Hayaloglu 2009; Akalin ve Karaman 2011; Oluk vd., 2014; Cakir vd., 2016). Benzaldehit peynirlerde bademimsi aromalı bir tatdır (Yaşa, 2018). Benzaldehitin biosentezi halen çok iyi açıklanabilmiş olmaması ile beraber fenilasetaldehit α -oksidasyonu sinamik asidin β -oksidasyonundan oluştuğu düşünülmektedir (Casey ve Dobb, 1992).

Genel olarak peynir örneklerinde aldehit varlığı düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. 3-metilbutanal aldehitler içerisinde en çok konsantrasyona sahiptir. Dallanmış zincirli aldehitlerden olan 3-metilbutanal maltımsı, baharat çeşnili, sert ve acı aroma ile karakterize edilmektedir (Rychlik ve Bosset, 2001. Corr a Lelles Nogueira vd., 2005).

Olgunlaşma ilerledikçe diğer aldehitlerde olduğu gibi seviyesinde azalma olmuş ve 60. günden sonra tespit edilememiştir. Çoğu çalışmada, aldehitlerin hızlı bir şekilde ilgili alkollere indirgenmeleri veya asitlere okside olmalarından dolayı peynirlerde geçici uçucu bileşikler oldukları belirtilmiştir (McSweeney ve Sousa, 2000; Hayaloglu ve Brechany, 2007; Masotti vd., 2017). 25 ve 15 nolu örneklerde proteoliz seviyesi daha yavaş olduğundan aldehit bileşiklerinin geçişi yavaş olmuştur. Civil peynir örneklerindeki 2-metil butanal, 3-metil butanal ve benzaldehit bileşikleri olgunlaşmanın 2. gününde tespit edilmişken olgunlaşmanın 90. gününde tespit edilemediği veya iz miktarda olduğu belirlenmiştir (Cakmakcı vd., 2013). Yüzeyden olgunlaştırılan peynirlere bakıldığında 3-metilbutanal Com e, Beaufort, Appenzeller, Chaumes, Tilsit ve Strachitunt (Bosset ve Gauch, 1993; Valero vd., 2001; Fuchsmann vd., 2015; Masotti; 2017) ve benzaldehit ise Com e, Raclette, T ete de Moine, Livarot ve Tilsit (Guichard vd., 1987; Bosset ve Gauch. 1993; Lawlor vd., 2002; Bona iti vd., 2005; Fuchsmann vd., 2015) peynir örneklerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.26 Model peynir örneklerinde saptanan aldehitler µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşen	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
901	2-Methylbutanal	T.E.	0.625	0.113	0.185	T.E.	0.549	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
905	3-Methylbutanal	6.683	3.994	2.238	3.298	2.387	5.445	0.033	0.086	1.129	0.239	T.E.	T.E.	T.E.	0.143	T.E.	T.E.
1529	Benzaldehyde	T.E.	0.079	0.321	0.164	0.080	0.083	0.297	0.041	0.037	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

4.3.8.3. Ketonlar

Ketonlar; serbest yağ asitlerinin enzimatik oksidasyonu ile β - ketoasitlerine, ardından söz konusu bileşiklerin dekarboksilasyonu ile metil ketonlara dönüşmekte ve düşük konsantrasyonda bile peynir aroması üzerinde etkili olmaktadır. Diasetil ve asetoin gibi ketonların oluşumu ise laktoz ve sitrat parçalanması sonucu oluşan pirüvatın yıkılmasıyla gerçekleşmektedir. Özellikle mavi damarlı peynirlerde ana uçucu bileşikler metil ketonların oluşturduğu belirtilmiştir (Voight vd., 2010).

Kontrol peyniri dışındaki peynir örneklerinde olgunlaşmanın ilk günündeki keton miktarı belirgin olup, genel olarak olgunlaşmanın ilerlemesi ile keton miktarlarında düşüş gözlemlenmiştir. Kontrol peyniri ile belirgin farklılık gösteren 2-bütanon ve 2-pentanon miktarı depolama boyunca artış olurken, 2-heptanon. 2-nonanon. 8-nonen-2-on ve 2-undekanon miktarlarında azalma olmuştur.

Metil ketonlar genel olarak meyvemsi, üzüksü ve çiçeğimsi (2-nonanon, 2 dekanon, 2-oktanon), tereyağımsı (diasetil ve asetoin), küflü peynir (2-heptanon) ve mantar (1-oken-3 on) gibi aromayla karakterize edilebilirler (Molimard ve Spinnler 1996, Curioni ve Bosset 2002). Özellikle Konya küflü peyniri bulamacı katkılı 15, 27 ve 28 nolu model peynirlerde örneklerine bakıldığında 2-butanon, 2-pentanon, 2-heptanon ve 2-nonanon en çok tespit edilen ketonlar olmuşlardır. 2-heptanon ve 2-nonanon Blue peynirlerin karakteristik ketonlarıdır (Lawlor vd., 2001; Molimard ve Spinnler, 1996; Tomasini vd., 1995; Urbach, 1993).

Örneklerimizdeki tespit edilen ketonlar ile Konya ilinde piyasadan toplanan ve 6 ay olgunlaştırmaya bırakılan küflü peynir örneklerinden üç adet peynir örneği üzerinde yapılan uçucu bileşik analizindeki saptanan keton çeşitleri ile orantısal varlıkları arasında benzerlikler bulunmaktadır (Hayaloglu vd., 2008). Türkiye peynirleri üzerine yapılan bir çalışmada 11 adet peynir örneği üzerinde yapılam GC-MS uçucu bileşikler analizinde 2-butanon, 2-pentanon, 2-heptanon ve 2-nonanon Divle Tulum peynirinde en çok konsantrasyona sahip ketonlar olarak belirtilmiştir (Hayaloglu ve Karabulut, 2013). Yüzeyden olgunlaştırılan peynir örneklerindeki uçucu bileşiklerde en çok rastlanan ketonlar 2-bütanon, 2-pentanon, 2-heptanon, 2-nonanon. 2-oktanon, 8-nonen-2-on ve 2-undekanon bileşikleridir (Bertuzzi vd., 2018).

Çizelge 4.27 Model peynir örneklerinde saptanan ketonlar µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
795	Acetone	0.974	0.909	1.092	1.112	0.691	0.659	0.308	T.E.	0.379	0.057	0.192	0.055	0.049	0.113	0.265	0.342
886	2-Butanone	T.E.	T.E.	0.553	0.905	T.E.	T.E.	6.15	4.262	5.201	T.E.	12.003	2.941	2.476	T.E.	7.844	9.724
961	2,3-Butanedione	0.598	T.E.	0.551	0.155	2.453	2.718	T.E.	T.E.	2.401	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
966	2-Pentanone	0.888	5.821	2.769	6.639	1.016	4.546	0.264	0.181	1.056	0.199	0.513	0.419	0.067	0.331	0.324	5.691
1071	2-Hexanone	T.E.	0.87	0.756	0.837	0.249	0.378	0.127	T.E.	0.431	0.212	T.E.	0.092	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1174	2-Heptanone	1.482	35.489	28.068	44.994	1.498	25.457	2.163	T.E.	1.882	5.625	3.774	4.417	0.139	3.109	1.765	4.678
1219	4-Octanone	0.453	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.175	T.E.	0.311	0.139	T.E.	T.E.	0.359	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1291	3-Hidroxy 1-Butanone	10.920	2.247	9.433	5.875	18.716	16.513	T.E.	0.142	11.484	T.E.	0.851	0.175	0.511	T.E.	0.793	1.007
1278	2-Octanone	T.E.	1.275	1.024	1.658	T.E.	0.917	0.077	T.E.	0.073	0.131	0.232	0.124	T.E.	0.035	0.033	0.296
1384	2-Nonanone	1.754	59.514	53.879	87.339	1.734	59.216	7.059	7.532	2.157	7.068	10.779	6.883	3.008	3.632	7.194	17.626
1439	8-Nonen-2-one	0.1	4.898	5.074	9.146	T.E.	5.07	T.E.	T.E.	T.E.	0.143	0.164	T.E.	T.E.	T.E.	0.151	2.634
1490	2-Decanone	0.591	0.379	0.363	0.421	0.176	0.312	T.E.	T.E.	0.15	0.116	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1596	2-Undecanone	0.068	0.673	0.881	1.398	0.121	0.783	0.396	0.415	0.247	0.438	0.332	0.209	0.065	0.088	0.332	1.346

4.3.8.4. Esterler

Esterler diğer uçucu bileşiklerine göre daha kompleks reaksiyonlarla oluşan bileşiklerdir. Aroma aktif esterler, kısa veya orta zincirli yağ asitleri ile alkollerin reaksiyonu (esterleşme) (McSweneey ve Sousa, 2000) ve toksik alkollerin yağ asitleri ile esterleşmesi (alkoliz) sonucu oluşan bileşiklerdir. Esterlerin oluşumunda asidoliz ve transesterifikasyon reaksiyonları da bir diğer oluşum mekanizmasıdır.

Bu tepkimelerde ester yapısında bulunan alkol veya yağ asidinin yer değiştirmesiyle esterlerin modifikasyonu gerçekleşmektedir (Liu vd., 2004). Esterleşme esterase ile alkollerden ve karboksilik asitlerden esterlerin oluşumu olup, alkoliz alkollerden ve açılgliserollerden veya açıl koenzim A'dan serbet amino asitler, serbest yağ asitleri ve/veya karbonhidratların metabolizmasından açıl transferaz ile türetilen) esterlerin üretimidir (Bertuzzi vd., 2018). Esterler, FFA'ların metabolizmasında dolaylı olarak yer alan bir başka uçucu bileşik grubudur; buradaki esterleşme ve alkoliz reaksiyonları, esterlerin biyosentezine yol açar (Collins vd., 2003a)

Peynirlerde esterlerin oluşumu erken olgunlaşma ile başlamaktadır. Aynı zamanda peynirlerde ester çeşitliliği de mevcuttur (Molimar ve Spinnler 1996). Etil asetat, Etil bütanoat, Etil heksonat ve Etil oktanat yüzeyde olgunlaşmış peynirlerde en yaygın tespiti yapılan esterlerdir (Bertuzzi vd., 2018).

Depolama süresince peynir örneklerindeki 29 adet ester çeşidi tespit edilmiş olup, (Çizelge 4.28) miktarı artış göstermiştir. Peynir örneklerindeki uçucu bileşikler içerisindeki ester miktarı Roquefort ve Strachitunt peynirlerinden az, Gorgonzola ve diğer mavi damarlı peynirlerden fazla olduğu belirlenmiştir (Gallois ve Langlois, 1990; Moio vd., 2000; Wolf vd., 2011; Masotti vd., 2017). Tespit edilen esterlere bakıldığında bulamacın peynirdeki olgunlaşma süresinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlara katkısından dolayı 30. günden itibaren miktar ve çeşitlerinde artış gerçekleşmiştir. En çok tespiti yapılan ester çeşitleri arasında asetat formunda olanlar olup, bunlar açıl koenzim A ve bir alkolden oluşmakta ve çoğunlukla etanolden alkol açıl transferazından türemektedir (Yoshioka ve Hashimoto, 1983).

Söz konusu bileşikler ortam sıcaklıklarında düşük algılanma eşiğine sahip olduklarından dolayı birçok peynirde aromaya çok düşük konsantrasyonlarda bile katkı sağlarlar. Buna ilaveten peynire meyvemsi, çiçeğimsi bir tat veren esterler, serbest yağ asidi kaynaklı hoş olmayan keskinliği de azalttıkları bildirilmekte (de Frutos vd., 1991; Curioni ve Bosset 2002;

Liu vd., 2004; Sable ve Cottenceau, 1999) ve peynirin olgunlaşması sırasında yağ asitleri ve aminlerden kaynaklanan keskin/acı tat gibi arzu edilmeyen aromaların baskılanmasına katkıda bulunmaktadır (Majcher vd., 2011; Evert-Arriagada vd., 2013).



Çizelge 4.28 Model peynir örneklerinde saptanan esterler µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
805	Methyl acetate	1.457	1.552	3.159	2.073	0.473	1.874	1.150	1.013	0.508	1.582	0.347	0.586	0.233	0.417	0.455	0.505
866	Ethyl acetate	0.699	T.E.	0.404	0.396	2.396	T.E.	9.430	7.121	3.347	5.546	7.677	11.701	1.970	13.876	2.554	21.310
943	Ethyl propanoate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3.490	T.E.	1.137	2.558	1.520	9.864
961	Propyl acetate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.639	0.452	T.E.	0.363	0.827	1.896	0.449	0.711	0.556	1.519
971	Methyl butyrate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2.844	5.629
1027	Ethyl butyrate	0.709	0.972	3.165	4.733	0.759	2.388	21.621	17.005	1.643	7.125	51.508	23.668	13.960	43.152	32.165	66.459
1039	Methyl thiolacetate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.145	0.094	1.323	0.419	0.091	3.607	6.865	0.737	T.E.	36.498	0.703	5.844
1061	Butyl acetate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.186	T.E.	T.E.	0.653	0.240	3.840	0.345	4.568	4.737
1108	Propyl butyrate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	4.608	6.090	3.243	6.808	5.044	11.298
1109	Isoamyl acetate	0.101	0.109	0.236	T.E.	0.430	0.071	0.772	1.460	1.650	0.158	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1119	Ethyl n-valerate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.161	T.E.	T.E.	0.142	1.505	T.E.	0.238	0.392	0.578	8.587
1125	Butyl propionate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.172	0.290	0.622	3.357
1142	Isobutyl butanoate	T.E.	0.070	0.065	0.074	0.089	0.048	0.137	0.097	0.047	0.096	T.E.	T.E.	0.028	T.E.	0.190	1.109
1188	Methyl Thiobutyrate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3.925	T.E.	T.E.
1206	n-Butyl n-butyrate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.221	T.E.	T.E.	8.891	T.E.	5.760	2.465	19.546	80.149
1221	Ethyl hexanoate	0.502	0.632	1.719	1.780	0.903	1.015	10.297	13.800	1.119	7.582	19.728	22.255	1.138	14.713	7.249	25.811
1254	Isoamyl butyrate	T.E.	0.069	T.E.	0.300	T.E.	0.178	0.874	0.397	T.E.	0.055	2.822	0.740	0.642	0.956	2.785	4.942
1292	Hexanoic acid. 1.1-dimethylpropyl ester	2.412	0.622	1.002	1.732	0.514	1.014	0.569	1.102	0.945	0.739	0.583	0.836	0.364	0.851	0.477	1.357

Çizelge 4.28 (devamı)

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
1306	Isobutyl hexanoate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.060	0.517	2.122	16.897
1334	Methyl trichloroacetate	0.501	0.674	0.608	0.295	0.475	0.433	0.579	T.E.	0.258	0.578	0.116	T.E.	0.123	0.550	0.081	T.E.
1339	Ethyl lactate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.081	T.E.	1.518	1.615	0.123	0.410	1.008	3.137	0.261	0.588	T.E.	T.E.
1364	Heptyl acetate	T.E.	0.330	0.350	0.309	0.184	0.202	0.088	0.293	0.047	0.128	0.385	T.E.	T.E.	0.119	0.175	0.212
1379	Methyl octanoate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.085	T.E.	0.358	0.362	0.076	0.578	0.461	0.501	T.E.	0.417	1.101	2.427
1404	Butyl caproate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.276	0.132	0.047	0.248	1.973	2.705
1407	Isobutyl lactate	1.339	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.794	0.420	T.E.	T.E.	T.E.	1.227	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1426	Ethyl octanoate	T.E.	0.526	0.904	1.970	0.224	0.744	3.878	5.038	0.555	2.329	12.957	8.242	2.550	6.749	16.010	20.713
1589	Methyl caprate	T.E.	0.142	0.280	0.605	T.E.	0.147	0.124	0.327	T.E.	0.247	0.229	0.311	T.E.	T.E.	1.205	1.404
1632	Ethyl decanoate	T.E.	0.246	0.272	0.436	T.E.	T.E.	0.487	0.637	T.E.	0.193	1.586	1.370	0.054	1.070	0.993	4.251
1683	Ethyl 9-decenoate	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	1.617	0.918	T.E.	0.359	15.634	1.798	1.367	2.868	15.179	14.869

4.3.8.5. Asitler

Yağ asitleri trigliseritlerin lipaz ya da esteraz aktivitesi sonucu birçok peynir çeşidinde oluşmakta ve olgunluk kriteri olarak bilinmektedir (Kırmacı vd., 2011. Güler ve Uraz, 2004). Yağ asitlerinin doğrudan aromaya katkıları olduğu gibi, ester, metil keton, alkol ve laktonların oluşumunda da öncül maddeler olarak rol alabilmektedirler (Molimard ve Spinnler, 1996). Peynirde bulunan asitlerin çoğu, süt yağının lipolizinden kaynaklanan serbest yağ asitleridir (Urbach, 1997).

En yüksek asit konsantrasyonu olgunlaşmanın ilerlemesi ile artma gerçekleşmiştir. Özellikle depolamanın 30. gününe kadar asit miktarındaki artış yavaş seyrederken 60. gündeki artış oranı daha hızlı olmuştur. Bu da peynir örneklerindeki 30. günden sonraki lipoliz olayının daha hızlı gerçekleşmesinden kaynaklanmıştır.

Peynir bulamacından kaynaklı lipolitik aktiviteden dolayı asit oranı yüksek düzeyde gözlenmiştir. Süt ürünlerinde belirlenen en önemli yağ asidi butanoik asittir ve peynirde yüksek oranda bulunmaktadır. Butanoik asit, peynire ransit aroma vermesinden dolayı aşırı miktarda oluşumu tat-koku kusuru olarak algılanır. Butanoik asit ve hekzanoik asit sert ve acı-keskin peynir aroması ile karakterize edildiği belirtilmektedir (Corrêa Lelles Nogueira vd., 2005). Asetik asit ise, peynire sirke aroması vermekte ve çeşitli peynirlerde de (Beyaz peynir, Domiati, Feta, Cheddar) yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

Peynir örneklerinin 60. gününde yüksek konsantrasyonlarda yedi adet asit tespit edilmiştir. Bunlar asetik asit, propanoik asit, pentanoik asit, 4-metil pentanoik asit, hekzanoik asit, oktanoik asit ve dekanolik asittir. 4-metil pentanoik asit, dekanolik asit ve heptanoik asit kontrol örneği olan 25 nolu örnek depolama süresince tespit edilmemiş olup, ısobütrik asit ise bulamaç ilaveli örneklerde tespit edilmemiştir. Yapılan bir çalışmada üretiminde *P. roquefort* kullanılan Strachitunt peynirinin 4-7 °C'de 75 gün depolanması sonucunda tespit edilen uçucu bileşiklerin yaklaşık %60'ı asit bileşiklerinden oluşmuştur (Masotti vd., 2017). Strachitunt peynirinde izole edilen yedi adet asit bileşiği ile benzerlik göstermiş olup, yüksek depolama sıcaklığının etkisi ile asit miktarında artış gerçekleşmiştir. Konya küflü peynir bulamacı ilaveli peynirlerde belirgin olarak küf kokusu aroması olan oktanoik asit varlığı ile kendini belirgin etmiştir. Sadece kontrol örneğinde var olan izobütrik asit ise çürük elma aroması olarak tanımlanır. Yine peynirlerdeki ransit tattan sorumlu hekzanoik asit ile dekanolik asit ile keskin sirke aroması olan asetik asit ve propanoik asit varlığı duyuşal değerlendirmede panelistlerce olumsuz tat ve lezzet olarak algılanmaktadır.

Çizelge 4.29 Model peynir örneklerinde saptanan asitler µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
1442	Acetic acid	18.548	T.E.	T.E.	T.E.	41.065	38.374	62.807	57.316	44.220	46.671	37.647	78.080	68.241	32.207	51.853	53.304
1527	Propanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	2.239	T.E.	1.903	2.035	151.653	153.537	187.379	137.889
1561	Isobutyric acid	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	3.264	T.E.	T.E.	T.E.	2.879	T.E.	T.E.	T.E.	1.954	T.E.	T.E.	T.E.
1618	n-Butyric acid	T.E.	25.092	27.709	48.612	14.968	93.450	139.185	124.375	57.375	61.267	T.E.	184.115	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1663	Valeric acid	40.755	8.765	2.088	9.901	17.553	25.555	4.949	3.051	18.676	4.969	6.107	4.286	19.311	11.462	67.348	178.149
1728	Pentanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	92.406	24.731	359.068	336.549
1795	4-Methyl pentanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	17.461	13.242	T.E.	15.334	52.685	18.047	T.E.	51.438	336.059	348.875
1837	Hexanoic acid	T.E.	40.896	78.495	84.561	T.E.	51.014	72.955	82.861	9.135	56.947	108.697	77.773	22.772	136.079	278.092	285.754
1951	Heptanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.519	0.671	T.E.	0.367	0.632	0.601	T.E.	0.721	2.989	4.474
2052	Octanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	23.960	T.E.	19.832	19.132	23.101	1.483	15.773	26.091	21.701	T.E.	54.092	227.303	334.648
2254	Decanoic acid	T.E.	T.E.	T.E.	15.109	T.E.	T.E.	3.599	4.806	T.E.	2.233	6.396	T.E.	T.E.	T.E.	29.677	32.824

4.3.8.6. Terpenler

Terpen bileşikleri bitki orjinlidir ve daha çok yüksek dağlık bölgelerde otlayan hayvanlardan süte geçmekte buradan da peynire geçmektedir (Şahingil, 2012). Olgunlaşma sırasında gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan bileşikler olmadığı, bu bileşiklerin varlığının peynirin yapıldığı coğrafik bölgeyle alakalı olduğu bildirilmiştir (Bezerra vd., 2017).

Peynir örneklerinde olgunlaşmanın ilk dönemlerinde farklı terpen bileşikleri varlığına rastlanılsa da, bütün peynir örneklerinde olgunlaşmanın 60. günü Limonen dışında başka bir terpen bileşiği izole edilmemiştir. Peynirlerde en fazla rastlanan terpen bileşiği α -Pinene kabul edildiğini belirten bir çalışmada kaşar peynirinde en çok izole edilen L-Limonen bileşiği olmuştur (Yılmaz, 2019). Civil, Çanak, Dil, Divle Tulum, Ezine, Hellim, Malatya, Mihalic, Örgü, Urfa ve Van Otlı peynirlerinde de bir veya iki terpen bileşiği izole edilmiştir. Bunlardan Örgü ve Mihaliç peynirleri hariç hepsinde Limonen bileşiği bulunduğu bildirilmiştir (Hayaloglu ve Karabulut, 2013).

Çizelge 4.30 Model peynir örneklerinde saptanan terpenler µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
1135	o-Xylene	0.138	0.172	0.285	0.235	T.E.	0.132	T.E.	0.115	T.E.	T.E.	T.E.	0.241	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1140	β-Myrcene	T.E.	0.152	0.204	0.390	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
1182	Limonene	1.907	1.712	3.170	4.433	1.118	0.679	1.328	1.664	1.142	1.337	1.511	1.411	0.318	1.429	0.577	1.126
1537	Linalool	T.E.	0.196	0.261	0.311	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

4.3.8.7. Çeşitli bileşikler

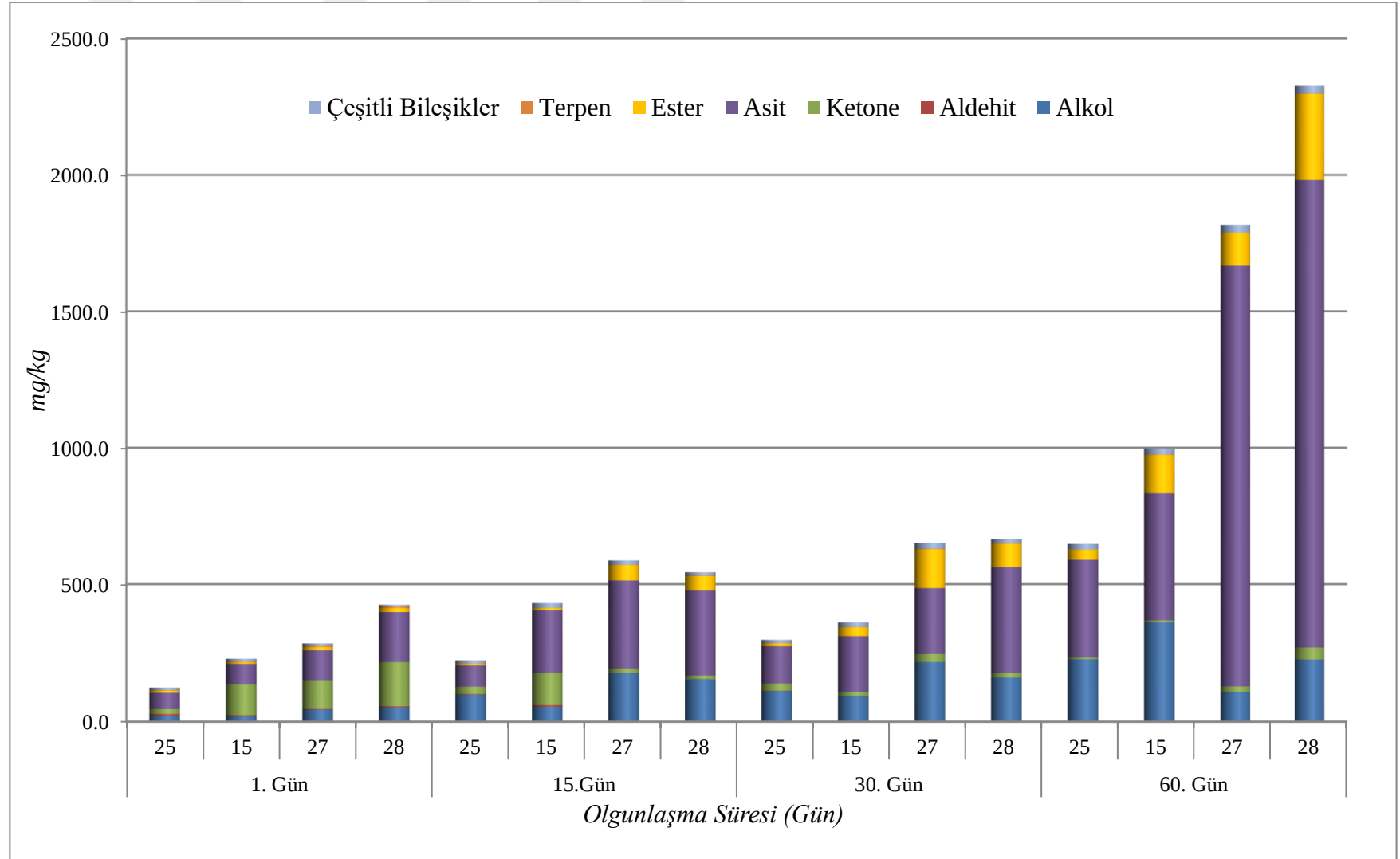
Çeşitli bileşikler olarak olgunlaşma süresince heptane, 2,5-dimethylhexane, 2-methylheptane, n-oktane, 2,4-dimetil heptan, 4-metilloktan, 2-metilnonan, 2,2,4,6,6-pentametilheptan, dekan, 2,2,4,4-tetrametiloktan ve dodekan olmak üzere birçok hidrokarbon bileşiği izole edilmiştir (Şekil 4.31). Çeşitli bileşikler içinde çoğunluğu hidrokarbon bileşikleridir. Hidrokarbonlar yağların otooksidasyonunun ikincil ürünleri olduğu bilinmektedir. Hidrokarbonların peynir olgunlaşması esnasında lipid oksidasyonu sonucunda olgun peynirlerde sıklıkla tespit edilen bileşikler olduğu, bu bileşiklerin peynir aromasına direkt etkide bulunmadığı, ancak aromatik bileşenlerin oluşumunda öncül maddeler oldukları ifade edilmiştir (Ferreira vd., 2009; Karali vd., 2013; Calzada vd., 2014).

Sülfür içeren bileşikler metionin veya metionin amino asiti içeren peptitlerin olgunlaşma süresince oksidatif reaksiyonlar sonucunda degradasyonu ile üretilmektedir (Hayaloglu, 2009). Dimethyl sulfide olgunlaşmanın ilk ayında tüm peynir örneklerinde tespit edilen sülfür bileşiği olup, olgunlaşmanın ilerlemesi ile Dimetil disülfid bileşiğininde olduğu tespit edilmiştir. Dimetil sülfid, sistein ve metionin gibi serbest radikal gruplarında sülfür bulunduran amino asitlerin parçalanması sonucunda meydana geldiği belirtilmektedir (Cholet vd., 2008; Castada vd., 2014; Fuchsmann vd., 2015).

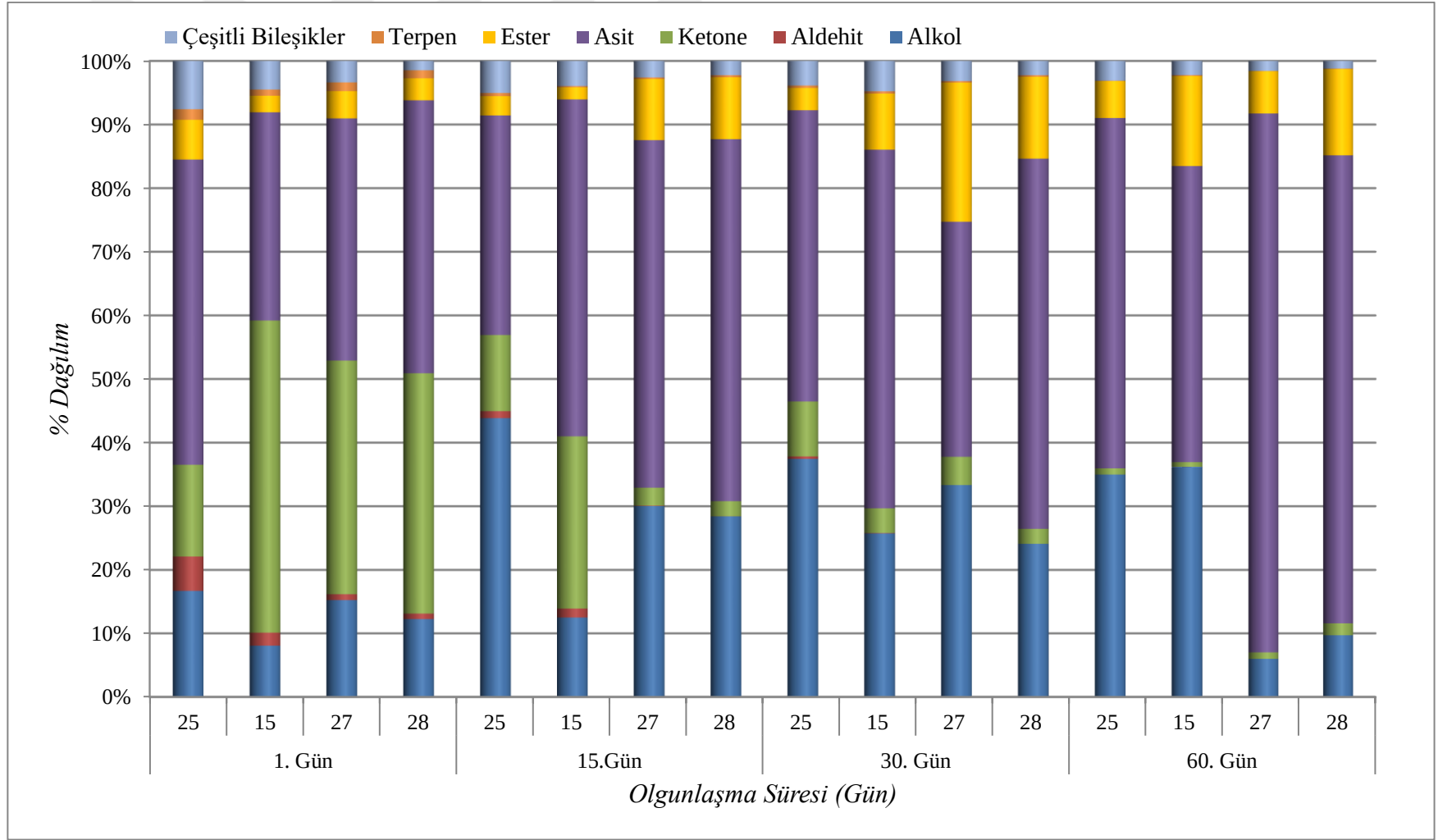
Sülfürlü bileşiklerin sarımsak içeren ve olgun peynir kokuları ile karakterize edildiği, düşük konsantrasyonlarda bile peynire belirgin duyusal özellik kazandırdığı, dolayısıyla konsantrasyonlarındaki küçük bir değişimin bile peynir aromasında önemli bir farklılığa neden olabileceği bildirilmiştir (Stelios vd., 2009; Fuchsmann vd., 2015).

Çizelge 4.31 Model peynir örneklerinde saptanan çeşitli bileşikler µg/100 g peynir

RI	Uçucu Bileşik	1. Gün				15. Gün				30. Gün				60. Gün			
		25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28	25	15	27	28
718	Methanethiol	1.279	0.903	0.753	0.118	T.E.	1.569	T.E.	T.E.	1.281	1.698	T.E.	T.E.	T.E.	3.832	1.608	6.569
725	Heptane	0.859	0.698	0.808	0.108	1.026	1.136	2.705	1.936	1.224	1.123	1.308	1.467	1.399	1.275	1.349	1.863
733	2,5-Dimethylhexane	1.590	1.547	T.E.	T.E.	2.046	2.915	3.218	2.961	2.478	1.760	1.966	2.507	7.473	T.E.	T.E.	T.E.
750	Dimethyl sulfide	0.073	0.097	0.107	T.E.	0.111	0.160	0.043	0.082	0.108	0.081	T.E.	0.089	0.053	0.157	0.026	T.E.
755	2-Methylheptane	0.330	0.520	0.093	0.306	0.373	0.401	0.059	0.115	0.331	0.166	0.110	0.139	0.070	0.104	0.026	T.E.
781	n-Octane	0.216	0.346	0.226	0.338	0.331	0.533	0.321	0.328	0.439	0.298	0.294	0.428	0.117	0.253	0.064	0.181
790	2,4-dimethylheptane	0.328	0.489	0.263	0.223	0.361	0.598	0.352	0.240	0.416	0.223	0.283	0.341	0.140	0.236	0.050	0.525
836	4-Methyloctane	1.827	2.530	1.377	0.756	2.325	2.342	T.E.	1.325	2.223	1.440	2.438	1.865	7.622	2.411	T.E.	T.E.
843	Tetrahydrofuran	0.524	0.814	0.293	T.E.	0.854	0.600	0.857	T.E.	0.627	0.427	T.E.	T.E.	0.783	1.740	T.E.	T.E.
943	2-Methylnonane	0.371	0.615	0.656	0.585	1.315	0.822	0.570	0.123	0.426	0.482	T.E.	0.219	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
947	2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	0.120	0.209	2.143	2.137	0.454	2.290	3.497	2.283	0.092	2.052	8.936	4.349	0.228	7.007	22.625	13.049
953	3-Methylnonane	T.E.	0.170	0.211	0.077	0.370	0.100	0.647	0.296	0.035	0.377	T.E.	0.497	0.626	0.104	T.E.	T.E.
989	Decane	1.116	1.341	0.999	1.404	1.143	1.883	1.471	1.226	1.119	1.331	2.945	1.609	1.050	2.583	1.116	1.128
1005	2,2,4,4-Tetramethyloctane	T.E.	T.E.	0.195	0.169	T.E.	0.148	0.219	0.137	T.E.	0.123	0.570	0.273	T.E.	0.528	0.303	1.655
1064	Dimethyl disulfide	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.139	0.136	T.E.	4.937	T.E.	0.097	T.E.	1.128	0.084	0.187
1171	Dodecane	0.752	T.E.	1.486	T.E.	0.515	1.562	1.125	0.958	0.649	0.723	1.806	0.971	0.567	0.880	1.164	2.793
1642	Butyrolactone	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.058	0.018	0.023	T.E.	0.057	0.048	T.E.	0.027	0.026	0.157
2076	4-Methylphenol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	0.280	0.317



Şekil 4-34 Olgunlaşma boyunca model peynir örneklerinde saptanan uçucu bileşik miktarları



Şekil 4-35 Olgunlaşma boyunca model peynir örneklerinde saptanan uçucu bileşik miktarları % dağılımı

4.3.9. Duyusal analizler

Duyusal değerlendirme çalışması peynirlerin olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde 9 puan skalası (1:Aşırı Kötü; 5: Orta; 9: Mükemmel) (Nicolas vd., 2010) kullanmak suretiyle Çizelge 4.32’de verilen duyusal kriterlere ilişkin panelistlerce peynir örneklerinde geniş kapsamlı renk, kesit, yapı, koku, tat, yabancı tat, süt tadı, olgunluk durumu, tuzluluk ve genel duyusal puanlama gerçekleştirilmiştir. Avrupa peynirleri üzerine yapılan kültürler arası duyusal bir araştırmada yerel ürünlere aşinalık bakımından belirli ölçüde tüketicilerin kökenine bağlı olduğu bildirilmiştir (Ojeda vd., 2021). Yerel bir peynirin bulamacının kullanıldığı model peynirin duyusal değerlendirmesinde panelistlerin yöre farklılığı duyusal değerlendirmede etkili olduğu söylenebilir. Gıda ürünlerinin tüketimi için güvenilir ve sağlıklı olması açısından tercih edilmesinde duyusal karakterler genel kabulünün büyük faktörleri olduğu varsayımını doğrulamaktadır (Urala ve Lähteenmäki, 2004).

Peynir duyusal özellikleri, lezzet, doku ve görünümü ürün kabul edilebilirliği ve pazardaki başarısı için kritik öneme sahiptir (Drake ve Delahunty, 2017). Buna göre, duyusal özellikleri güvenilir bir şekilde değerlendirmek gıda sektöründe hem tüketicilerin hem de piyasanın değişen taleplerine hızla cevap verebilmek için önemlidir (De Belie vd., 2003). Peynir çeşitleri aslında olgunlaşma yöntemlerine göre sınıflandırılır (McSweeney, 2011). Bundan dolayı da her peynir çeşidinin duyusal özellikleri de farklı olmaktadır. Her peynir tipinin tanımlayıcı analizi için kapsamlı bir duyusal dil veya lezzet sözlüğü oluşturulmuştur. Lezzet sözlüğü, her peynir tipine özgü lezzet özelliklerini tanımlamak için geliştirilen teknik bir sözlüğü temsil eder (Drake ve Civille, 2003).

Üretim ve olgunlaştırma parametrelerinde farklılık bulunan model peynir örneklerimize ilişkin tanımlayıcı bir duyusal dil kullanılmamıştır. Panelistlerden örnekler arasındaki duyusal parametrelerin karşılaştırılması istenmiştir. Çalışmamızdaki model peynirlerin özellikleri ve flora farklılığı duyusal parametrelere etkisi söz konusu olmuştur. Peynirde tat ve aromaya; proteoliz, lipoliz ve serbest yağ asitlerinde meydana gelen değişimler ile pH önemli derecede etki etmektedir (Kirst, 2002). Konya küflü peynirinden kaynaklı sekonder florasının (*P. roqueforti*) olgunlaşmayı hızlandırmış ve aroma gelişimine katkıda sağlamıştır (Khattab vd., 2019). Danimarka mavi peynirinin kalitesi, lezzeti ve tadı, *P. roqueforti* büyümesine bağlı olan olgunlaşma süreciyle güçlü bir şekilde bağlantılıdır (And ve Nielsen, 2005). Ancak panelistler model peynir örneklerini tüketimi çok yapılan peynir çeşitlerinden

farklı olarak değerlendirme yaptıklarından sonuçların bazı parametrelere etkisi olumsuz olarak değerlendirilmiş olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 4.32 Model peynir örneklerine ait duyu analizi değerleri

	Günler	25		15		27		28	
Renk	1	8.06±0.93	a.A	7.75±0.86	a.A	6.25±1.77	b.A	6.38±1.36	b.A
	15	7.07±1.22	ab.AB	7.80±1.42	a.A	6.47±0.92	b.A	5.20±1.42	c.AB
	30	6.00±1.63	a.B	5.88±1.59	a.B	5.88±1.89	a.A	5.69±1.82	a.AB
	60	6.75±1.39	a.B	6.25±1.04	ab.B	6.00±1.41	ab.A	4.75±1.67	b.C
Kesit Yüzey	1	8.00±1.03	a.A	8.31±0.79	a.A	6.38±1.63	b.A	5.88±1.59	b.A
	15	6.20±0.68	b.BC	8.27±0.70	c.A	5.67±1.88	ab.AB	5.07±1.53	a.A
	30	5.88±1.71	a.C	5.31±1.96	a.B	5.63±2.00	a.AB	5.94±2.14	a.A
	60	6.88±0.83	a.B	6.00±1.07	a.B	4.75±0.89	b.B	3.50±1.51	c.B
Yapı Tekstür	1	7.75±0.93	a.A	7.75±1.24	a.A	6.69±1.70	b.A	6.06±1.53	b.A
	15	6.93±0.96	b.AB	8.00±0.76	c.A	5.53±1.73	a.AB	5.27±1.94	a.AB
	30	6.19±1.87	a.B	5.25±2.18	a.B	5.94±2.14	a.AB	5.69±1.89	a.AB
	60	6.25±1.49	a.B	4.75±1.28	b.B	4.50±1.07	b.B	4.50±1.07	b.B
Koku	1	6.56±1.55	a.A	6.75±1.69	a.A	6.50±2.07	a.A	6.19±1.91	a.A
	15	5.93±1.28	a.AB	6.93±1.44	b.A	5.27±1.28	a.AB	6.07±1.10	ab.A
	30	5.00±1.90	a.B	3.81±2.01	a.B	4.94±1.95	a.BC	4.94±1.95	a.A
	60	5.63±1.60	a.AB	4.75±1.04	ab.B	3.75±0.89	b.C	2.25±1.16	c.B
Tat	1	7.25±1.44	a.A	6.63±1.45	ab.A	6.13±1.50	ab.A	5.50±1.67	b.A
	15	5.13±1.85	a.B	6.87±1.73	b.A	5.53±2.20	ab.A	5.07±2.12	a.A
	30	4.50±2.07	a.B	3.94±1.81	a.B	3.88±1.75	a.B	4.25±1.77	a.A
	60	4.50±1.20	a.B	3.88±0.99	ab.B	3.00±1.07	bc.B	2.25±1.16	c.B
Yabancı Tat	1	1.81±1.76	a.A	2.44±2.10	ab.A	2.81±1.91	ab.A	3.31±1.92	b.A
	15	2.80±1.78	a.A	2.47±2.23	a.A	3.60±2.13	a.AB	3.73±2.34	a.AB
	30	5.13±2.13	a.B	5.50±2.00	a.B	5.31±1.85	a.C	5.25±1.53	a.B
	60	4.63±1.41	a.B	5.13±1.55	a.B	5.13±1.81	a.BC	5.38±2.20	a.B
Süt Tadı ve Kokusu	1	6.81±1.47	a.A	6.13±1.45	ab.AB	6.00±1.90	ab.A	5.31±2.12	b.A
	15	6.00±1.46	a.AB	6.87±1.77	a.A	6.00±2.48	a.A	5.87±2.23	a.A
	30	4.88±1.75	a.AB	5.13±1.71	a.B	5.25±1.98	a.A	5.25±1.91	a.A
	60	5.88±1.36	a.B	5.38±1.51	a.B	5.75±1.49	a.A	5.50±1.85	a.A
Olgunluk Durumu	1	3.88±2.00	a.A	4.00±2.13	a.A	4.25±2.14	a.A	3.81±2.07	a.A
	15	5.67±1.18	a.B	6.67±1.29	a.B	5.87±2.39	a.A	5.27±2.05	a.AB
	30	5.81±1.76	a.B	5.38±1.86	a.AB	5.94±1.95	a.A	6.00±1.90	a.B
	60	5.50±1.60	a.B	5.75±1.83	a.A	5.75±2.12	a.A	5.88±2.36	a.B

a, b, c : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A.B.C : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

Çizelge 4.32 (devamı)

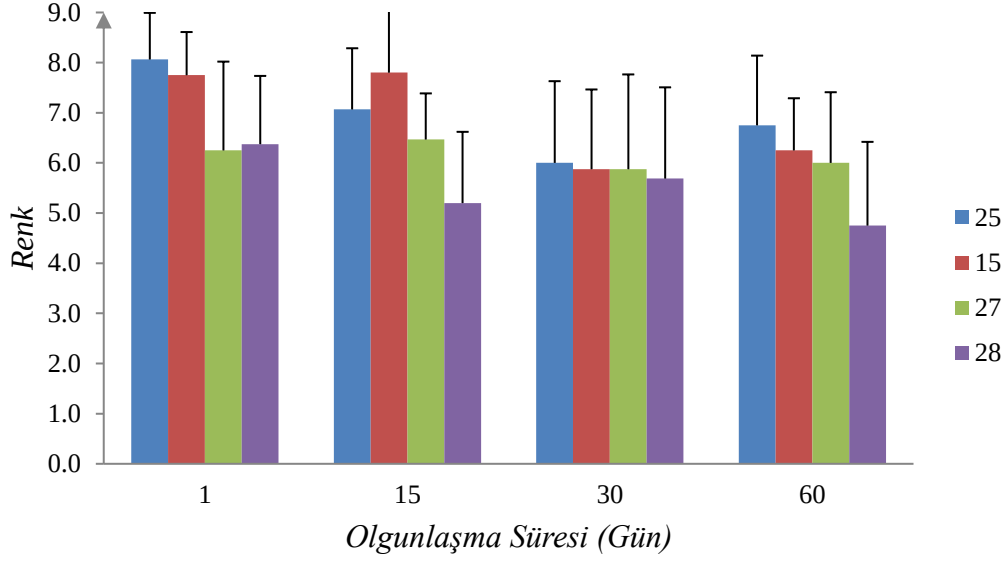
	Günler	25	15	27	28
Tuzluluk	1	5.94±2.02 a.A	5.81±2.17 a.A	5.94±1.98 a.A	5.50±2.19 a.A
	15	5.33±1.63 a.A	6.13±1.88 a.AB	5.47±1.88 a.A	5.33±1.95 a.A
	30	5.69±1.85 a.A	5.56±1.79 a.AB	5.13±1.86 a.A	5.25±1.73 a.A
	60	4.88±0.83 a.A	4.50±0.53 a.B	4.38±0.92 a.A	4.88±1.25 a.A
Genel Kabul Edilebilirlik	1	6.13±1.45 a.A	6.31±1.25 a.A	5.75±1.39 a.A	5.25±2.08 a.A
	15	5.07±1.67 a.A	6.27±1.75 a.A	5.33±2.47 a.A	5.13±2.36 a.A
	30	4.88±2.33 a.A	4.44±2.61 a.B	5.19±2.29 a.A	5.19±2.23 a.A
	60	6.00±1.69 a.A	5.38±1.92 a.AB	5.13±2.36 a.A	4.88±2.42 a.A

a, b, c : Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

A,B,C : Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen değerler birbirinden $P<0.05$ düzeyinde farklıdır.

4.3.9.1. Renk

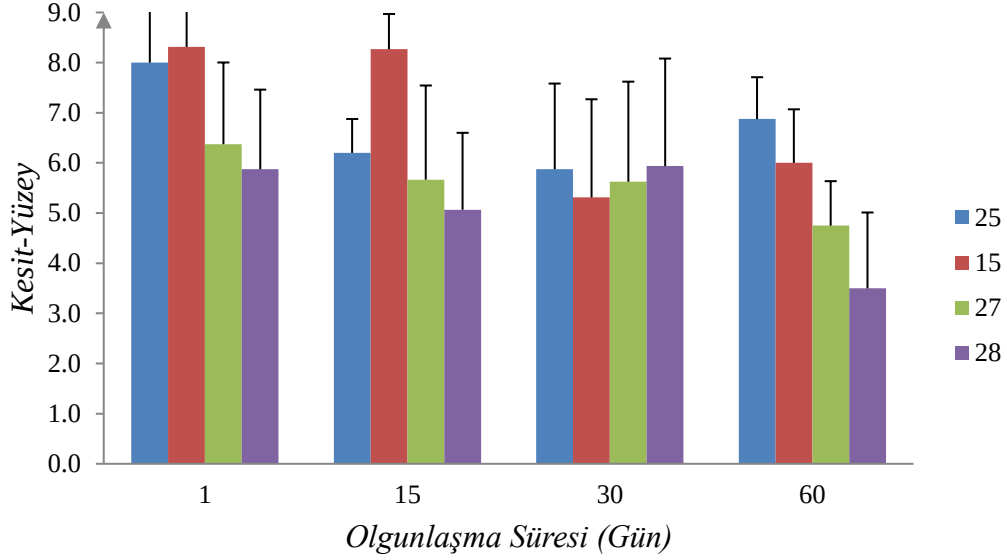
Model peynir örneklerinde istenmeyen renk (1) ve parlak renk (9) aralığında gerçekleştirilen duysal değerlendirmede olgunlaşma süresi boyunca renk değerlerinde azalma meydana gelmiştir. Olgunlaşmanın 1. gününde en yüksek renk puanı kontrol örneği olan 25 nolu peynirde 8.06 iken en düşük renk puanı 6.25 ile 27 nolu peynir örneği olmuştur (Şekil 4.36). Olgunlaşma derecesinin ve süresinin etkili olduğu renk puanlamaları olgunlaşmanın 60. gününde 4.75 ile 6.75 aralığında olmuştur. Kesim 4.3.6 renk analizi kısmında belirtilen L^* aydınlık renk parametresi değerindeki azalma duysal değerlendirmede istenmeyen parlaklık azalması renk görünümü olarak değerlendirilmiştir. Model peynir örneklerindeki renk duysal değerlendirmesi puanlamalarına bakıldığında olgunlaşmanın 30. günü istatistiksel olarak anlamsız olurken 1, 15 ve 60. günleri anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($P<0.05$).



Şekil 4-36 Olgunlaşma süresince peynirlerin renk duyusal değerleri

4.3.9.2. Kesit-Yüzey

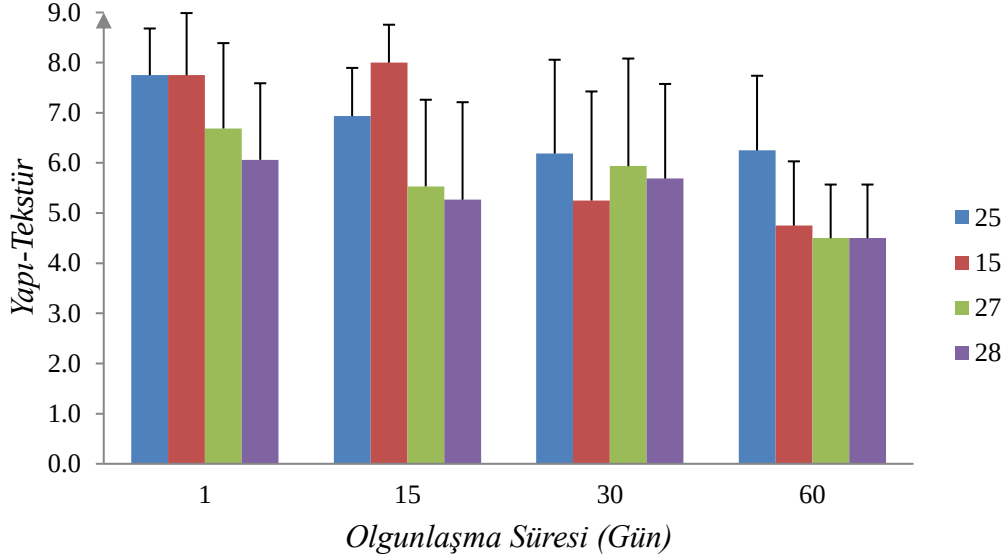
Olgunlaşma süresi boyunca 27 ve 28 nolu model peynirlerin kesit-yüzeylerinde belirgin azalmalar gözlenmiş ve 60. günlerinde orta seviyenin altına inmişlerdir. 15 nolu peynir örneği düşük depolama sıcaklığına rağmen 1 ve 15. günlerinde kesit-yüzeyde değişiklik gözlenmezken 30. gün diğer örneklerde olduğu gibi pütürlü kesit yüzeylerin arttığı görülmüştür (Şekil 4.37). Ancak 15 ve kontrol peyniri 25 nolu peynir örnekleri 60. günlerinde düzgün kesit yüzeylerinde iyileşme olmuştur. Panelistlerce düzgün-parlak ve pütürlü kesit-yüzey değerlendirmesi olgunlaşmanın 1. gününde 5.88 – 8.31 aralığında olmuştur. Örnekler arasında 1., 15. ve 60. günlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($P<0.05$) varken olgunlaşmanın 30. günü peynirlerin arasında kesit-yüzey farklılığı gözlenmemiştir ($P>0.05$).



Şekil 4-37 Olgunlaşma süresince peynirlerin kesit-yüzey duyusal değerleri

4.3.9.3. Yapı-Tekstür

Peynirlerin hava kabarcık dağılımı, kıvamı, homojen yapı ve pütürlü yapı bakımından yapılan duyusal değerlendirme kesit-yüzey ile benzerlik göstermiştir. Olgunlaşmanın ilerlemesi ile peynir örneklerinin yapısında yumuşama gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 1. günü 6.06-7.75 aralığında olan değerlendirme puanları 60. günde 4.50-6.25 aralığında olmuştur. Kontrol örneği dışında kalan Konya küflü peynir bulamacı ilaveli peynir örnekleri 60. gün yapı-tekstür duyusal değerleri orta seviyenin altına inmiştir (Şekil 4.38). Yapı-tekstür değerlerindeki bu azalma bu peynirlerde proteoliz nedeniyle (özellikle α_{s1} -kazeinin parçalanması) yapıda meydana gelen yumuşamadan kaynaklanabilir (Lawrence vd., 1987; Fox vd., 1996). İleri proteoliz seviyeleri gösteren 15. 27 ve 28 nolu peynir örneklerinde meydana gelen yumuşama duyusal değerlendirmede yapı-tekstürün düşük puan almasında etkili olmuştur. Örnekler arasında olgunlaşmanın 30. günü peynirlerin arasında yapı-tekstür farklılığı önemli düzeyde etkili olmazken, 1., 15. ve 60. günlerde anlamlı değişkenlik göstermiştir ($P<0.05$).

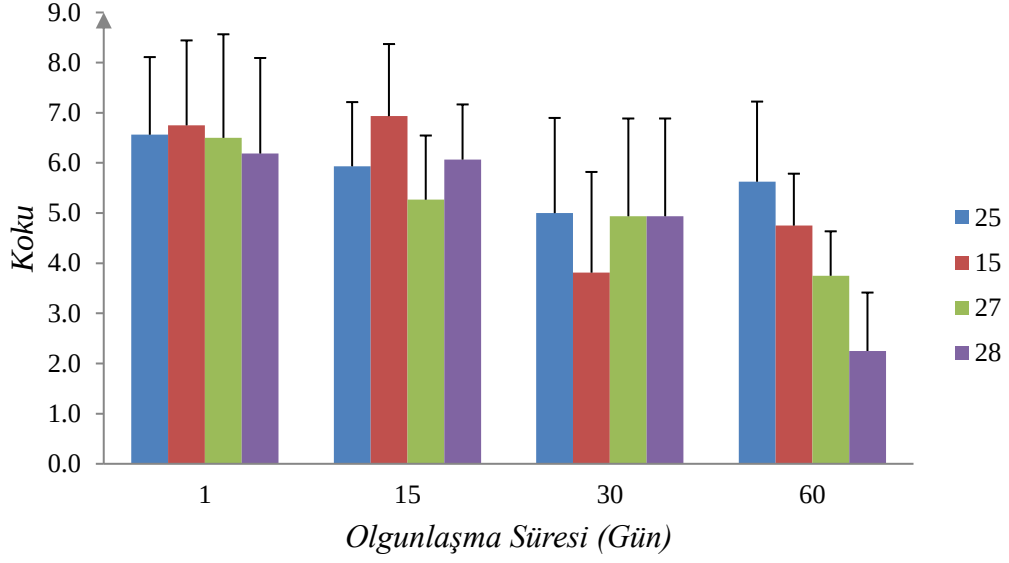


Şekil 4-38 Olgunlaşma süresince peynirlerin yapı-tekstür duyusal değerleri

4.3.9.4. Koku ve Tat

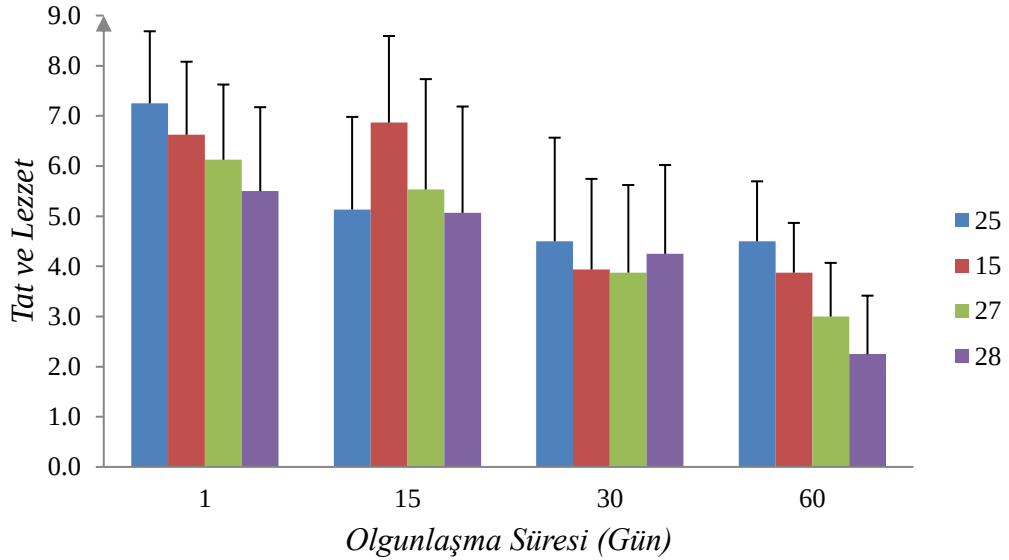
Model peynir örneklerine ait koku, tat-lezzet, yabancı tat ve süt tadı puanlamaları Çizelge 4.31’de verilmiştir. Peynirlerde olgunlaşma boyunca oluşan önemli biyokimyasal reaksiyonlardan birisi olan uçucu nitelikte koku ve tat bileşenlerinin oluşumudur. Olgunlaşmanın bu aşaması bazı kaynaklarda proteolizin tersiyer fazı olarak da nitelendirilmektedir. Ancak subjektif yöntemlerle bu durumun ortaya konması oldukça zordur (Hayaloglu, 2003). Peynirde tat ve aromaya proteoliz, lipoliz ve serbest yağ asitlerinde meydana gelen değişimler ile pH önemli derecede etki etmektedir (Şahingil, 2012).

Koku değerlendirmesinde olgunlaşmanın 1. günü 6.19-6.56 arasında değişirken olgunlaşmanın ilerlemesi ile değerlendirme aralığında genişleme olmuş ve 60. gün 2.25-5.63 aralığında puanlanmıştır. Sıcaklık ile birlikte bulamaç ilavesi peynirlerde panelistlerin damak tadına hitap edebilen koku beğenisinin depolama ilerledikçe düştüğü görülmektedir (Şekil 4.39). İstatistiksel bakımından olgunlaşma süresince panelistlerin duyusal değerlendirmelerine bakıldığında 1. ve 30. günleri peynir örnekleri arasında fark bulunmamıştır ($P>0.05$). 15. gün ve özellikle bulamaç ilaveli peynirlerde ise 60. günde istenmeyen kötü kokuların algılanması sonucu farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4-39 Olgunlaşma süresince peynirlerin koku duyusal değerleri

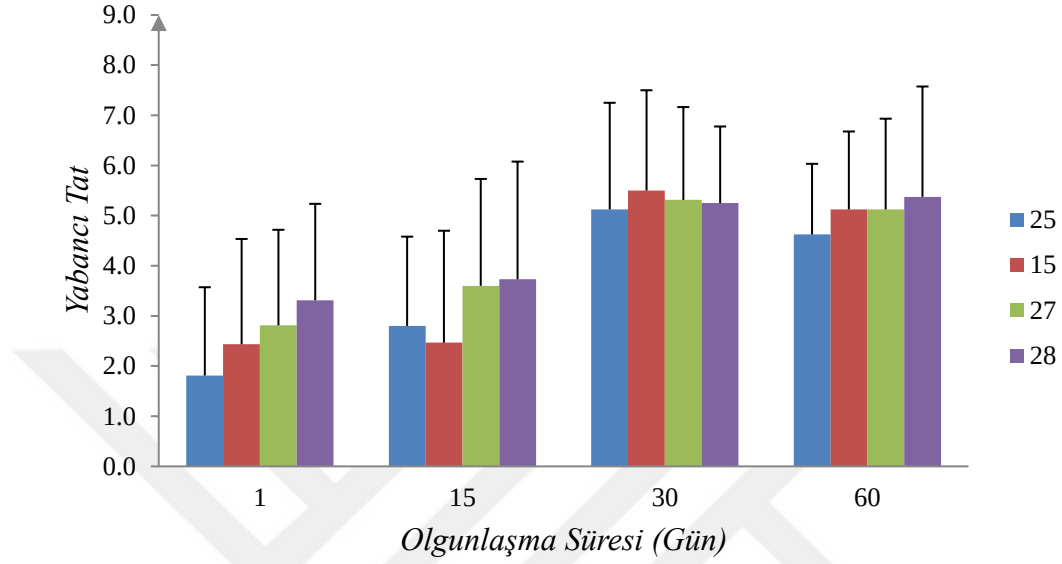
Peynir tadı ve lezzeti ürünün kalitesi ve tüketici kabul edilebilirliği açısından en önemli kalite kriterlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Yılmaz, 2019). Depolamanın 30. gününden itibaren peynirlerin tat ve lezzet değerleri panelistlerce istenen seviyenin altında değerlendirilmiştir (Şekil 4.40). Olgunlaşmanın 1. ve 60. günlerinde belirlenen tat ve lezzet puanlamaları arasındaki farklılık önemlilik arz etmiştir ($P<0.05$).



Şekil 4-40 Olgunlaşma süresince peynirlerin tat ve lezzet duyusal değerleri

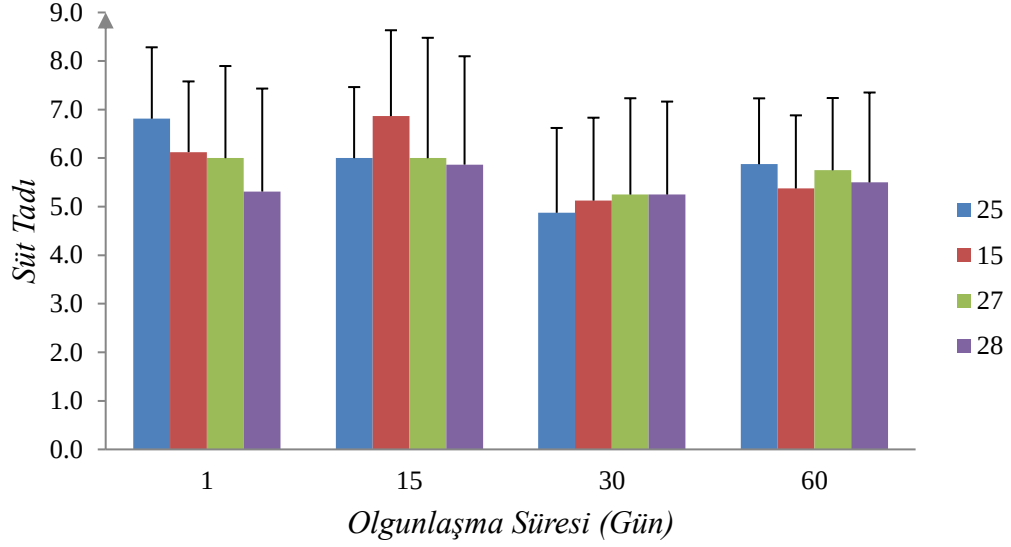
Model peynirlerde aroma gelişimi ile olgunlaşmanın ilerlemesi sonucu oluşan tat bileşenlerinin panelistlerce algılanma farklılığını ortaya koymak için yapılan yabancı tat

duyusal değerlendirmeye esas olgunlaşma sũresi boyunca grafiksel gũsterimi şekil 4.41’da verilmiştir. Tat ve lezzet değerlendirmesinin aksi yũnde değerlendirilme yapıldığı gũrũlmektedir. Olgunlaşma boyunca yapılan duyusal analizlerde yabancı tat puanlamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları saptanmıştır ($P>0.05$).



şekil 4-41 Olgunlaşma sũresince peynirlerin yabancı tat duyusal değerleri

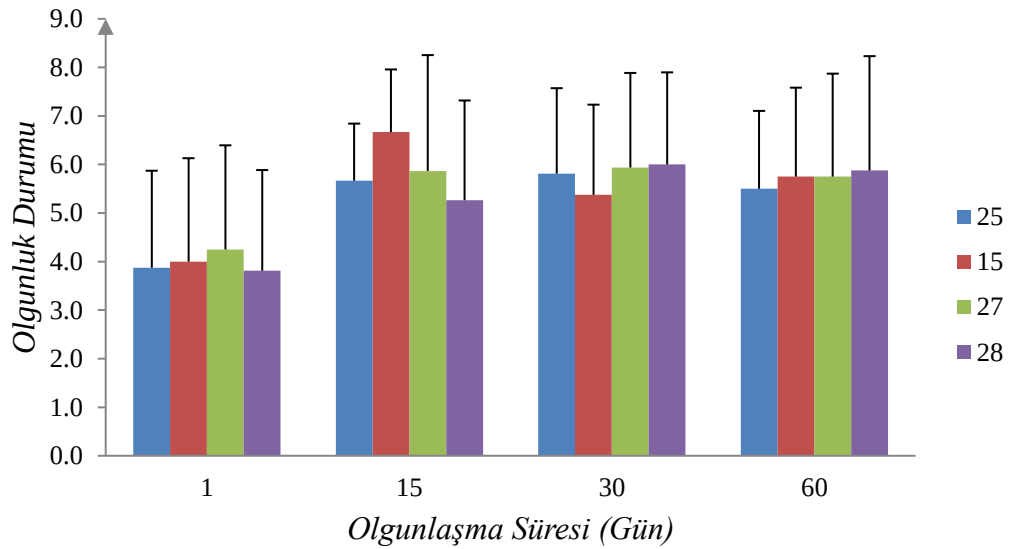
Yine olgunlaşma boyunca peynir ȳrneklerinde algılanan sũt tadının olgunlaşma ile bũtũn peynir ȳrneklerinde azalış gũsterdięi, ȳzellikle olgunlaşmanın 30. gũnũ bũtũn peynir ȳrneklerinin en dũřũk değerleri aldığı gũzlenmiřtir (şekil 4.42). ȳrnekler arasında olgunlaşma sũresi boyunca yapılan puanlamaların istatistiksel farklılık bulunmamaktadır ($P>0.05$).



Şekil 4-42 Olgunlaşma süresince peynirlerin süt tadı duyuşal değeri

4.3.9.5. Olgunluk durumu

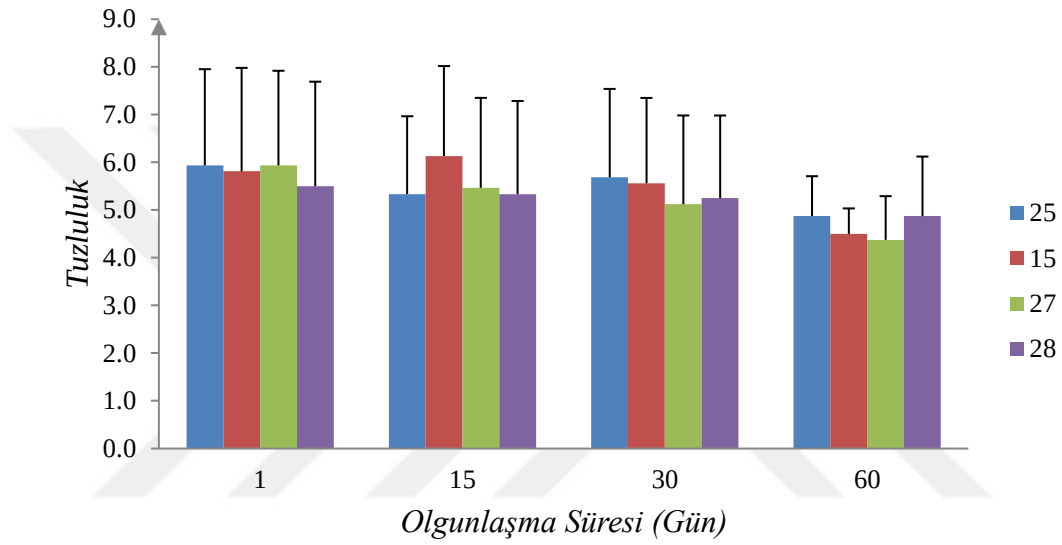
Model peynirlerdeki olgunlaşmanın azot fraksiyonları ve proteoliz seviyelerinin panelistlerce duyuşal olarak ilişkisi amacıyla yapılan puanlamalar Çizelge 4.31’de ve grafiksel olarak Şekil 4.43’da verilmiştir. Olgunlaşma süreci boyunca olgunluk için yapılan puanlamalar arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır ($P>0.05$) Her olgunlaşma günü için panelistlerin peynirlerin olgunluk puanlama aralıkları birbirine yakın değeri almıştır. Peynir örneklerinin olgunluk durumları değeri duyuşal olarak kısa aralıkta yer alması nedeniyle ayırt edicilik ve kıstasın güç olduğunu göstermektedir.



Şekil 4-43 Olgunlaşma süresince peynirlerin olgunluk duyuşal değeri

4.3.9.6. Tuzluluk

Deneme peynir üretiminden tecrübe ile kabul edilebilir ve deneysel çalışmalara uygunluk olarak belirlenerek üretilen model peynirlerdeki % 1 sabit tuz konsantrasyonu panelistlerce kabul görmüş ve genel olarak 4-6 aralığında puan alarak peynirlerde tuzluluğun orta seviyeler düzeyinde olduğunu göstermiştir (Şekil 4.44). Depolamanın ilerlemesi ile kuru madde miktarının artması ile kuru maddedeki tuz seviyesinde artış olması tuzluluk seviyesinde artışa neden olmuştur. İstatistiksel anlam ifade edebilecek bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).

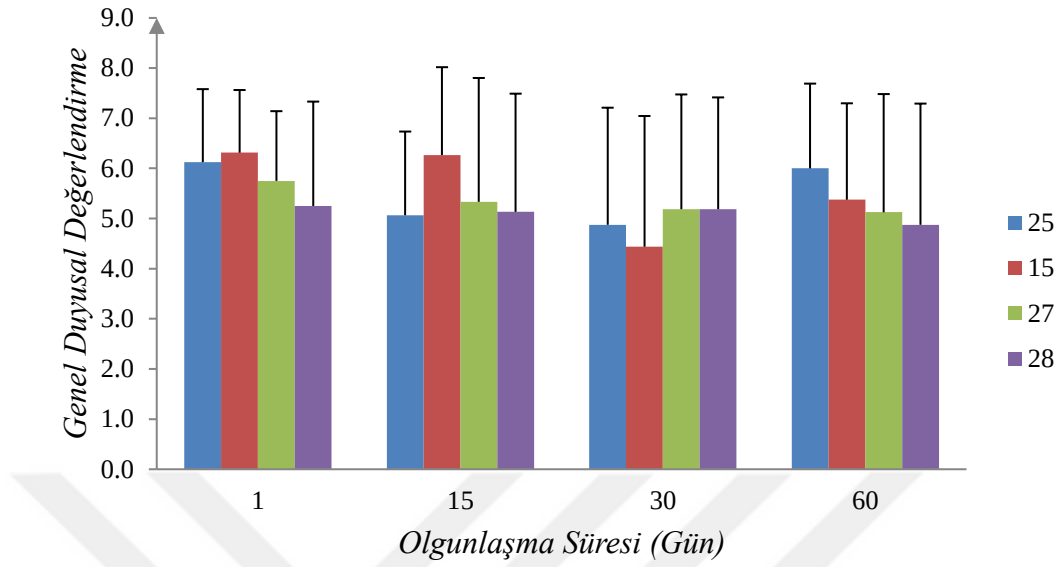


Şekil 4-44 Olgunlaşma süresince peynirlerin tuzluluk duyusal değerleri

4.3.9.7. Genel kabuledilebilirlik

Peynirlerin genel duyusal değerlendirmesi renk, görünüş, kesi-yüzey, yapı-tekstür, tat, koku vb. özelliklerin tamamını kapsamaktadır ve bu da peynirlerin duyusal olarak genel kabul edilmesinde önemlilik arz etmektedir. Olgunlaşma süresince peynir örneklerinde panelistlerce yapılan genel değerlendirmeye ait puanlar Çizelge 4.31’de ve değişimi ise Şekil 4.45’de verilmiştir. Olgunlaşmanın 1. ve 15. günleri 15 nolu örnek, 30. günü 27 ve 28 nolu peynir örnekleri ve 60. günü ise 25 nolu kontrol örneği en yüksek kabul edilebilirlik puanına sahip olmuştur. Genel olarak değerlendirmeleri 1. gün 5.25-6.13, 15. gün 5.07-6.27, 30. gün 4.44-5.19 ve 60. gün 4.88-6.00 puanlamalarını almışlardır. Bu puan aralıklarının kısa olması birbirine yakın değerlendirildikleri sonucunu vermektedir. Genel olarak panelistlerce model peynir orta seviyelerde puan almaları genel kabul edilebilir olduklarını göstermiştir. Bu

Çalışmanın tüketicici boyutu açısından önemli olacağı yönündedir. Peynir örnekler arasında dikkate değeri bir anlam farkı bulunmamaktadır ($P>0.05$).



Şekil 4-45 Olgunlaşma süresince peynirlerin genel kabuledilebilirlik değeri

4.4. Genel Değerlendirme

Literatürde proteoliz, olgunlaşma ve bioaktif peptit oluşumu üzerine çalışması bulunmayan küflü peynir bulamacı kullanılarak model peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Bulamaç için izole edilen tüm küflerin yarıya yakın kısmı *P. roqueforti* dominant tür küf içeren Konya ve yöresi küflü peyniri kullanılmıştır. Bulamaç ilavesinin model peynirde proteoliz ve bioaktif peptit oluşumuna etkisinin yanı sıra olgunlaştırma periyoduna avantajı ile peynir aroması, ACE-inhibisyon aktivitesi, enzim aktivitesi, antioksidan, duyuusal vb. özelliklerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak bulamaç oranı, tuz oranı ve depolama sıcaklığı koşullarının belirlenmesi amacıyla Design Expert v.9 paket programı kullanılarak 36 adet deneme model peynir örneği üretimi iki tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. Deneme model peynir örnekleri bir aylık olgunlaşmaya bırakılmıştır. Depolama sonunda ortalama değerleri kuru madde %49.56, protein %18.83, yağ %26.59 olarak hesaplanmıştır. Kimyasal analizlerinden pH 5.12-6.41, laktik asit %0.144-1.152 ve suda çözünen azot 0.169-0.548 aralığında ölçülmüştür. Depolama sıcaklığının arttırılması, ilave bulamaç oranı ve düşük tuz miktarı pH, %LA ve WSN değerlerinde artışa neden olmuş ve deneme model peynirlerinde bulamaçtan dolayı küf gelişimi gözlenmemiştir.

Bir aylık olgunlaşma süresi sonucunda WSN olgunlaşma indeks değerleri düşük tuz ve sıcaklık koşullarında % 9.86 iken bulamaç ilavesi ile % 19.66'ya ulaşmıştır. Konya küflü peynirinin proteolitik etkisinden dolayı olgunlaşma hızlanmıştır. Çalışmamızın temelini oluşturan Konya küflü peynirinin model peynir üretiminde kullanılarak olgunlaşması hızlanmış peynirlerde proteoliz ve bioaktif peptit oluşumuna etkisinin incelenmesi amacıyla ana üretim model peynirleri belirlenmiştir. Bir tanesi kontrol örneği olmak üzere 4 adet peynir örneği iki tekerrür olarak üretilmiş ve peynirler 60 gün süre ile olgunlaştırılmışlardır. Olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde peynirlerin analizleri yapılmıştır. Bu bölümde peynirlerin olgunlaşma sırasındaki kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri ile biyokimyasal ve duyuusal özelliklerinde meydana gelen değişimler özetlenmiştir.

Model Peynirlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Vakum ambalaj içerisinde depolanan peynir örneklerinde olgunlaşma boyunca bir miktar su ayrılması olmuştur. 1. gün % 46.97-48.57 olan kuru madde oranı 60. gün %47.93-51.60'lara yükselmiştir. En az su ayrılması depolama sıcaklığı diğerlerinden düşük olan 15 nolu örnekte gerçekleşmiştir. Kuru madde miktarı olgunlaşma süresince 27 ve 28 nolu örneklerde istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmazken 25 ve 15 nolu örneklerde önemli

bulunmuştur ($P<0.05$). Peynirlerin yağ ve kuru maddede yağ oranlarında önemli bir değişim görülmemiştir ($P>0.05$). Peynir üretiminde % 1.0'lık düşük seviyede sabit tuz oranı kullanılması olgunlaşma boyunca kuru madde miktarındaki değişimden etkilendiğinden kuru maddedeki tuz oranlarının değişiminde olgunlaşma boyunca önemli farklılıklar saptanmıştır ($P<0.05$). pH ve titrasyon asitliği bakımından bulamaç ilavesinin etkisi olmuştur. 1. gün 0.18 – 0.30 aralığında olan titrasyon asitliği olgunlaşma ile beraber 30. güne kadar yükselmiş (0.60-0.92), 60. gün 0.58-0.81 aralığında ölçülmüştür. Bulamaç ilavesi titrasyon asitliğinin yükselmesine neden olmuştur. Benzer durum pH ölçümünde de görülmüştür. 1. gün 6.22-6.44 pH'ı olan peynirlerde 30. güne kadar pH düşerek 5.37-5.65 seviyelerine kadar inmiştir. Tekrardan pH yükselerek 60. gün 5.58-6.30 aralığında olmuştur. Kontrol örneğine göre bulamaç ilaveli 27 ve 28 nolu peynirlerde pH daha fazla yükselme göstererek 60. gün tekrar başlangıç seviyelerine ulaşmıştır. Hem titrasyon asitliği hem de pH değerleri her örnek için olgunlaşma boyunca önemli farklılıklar olmuştur ($P<0.05$). Örnekler vakum ambalajda muhafaza edildiklerinden protein geçişleri olmamıştır. Bu nedenle olgunlaşma süresi boyunca model peynirlerin protein miktarlarında anlamlı farklılık olmamıştır ($P>0.05$).

Peynir örneklerin olgunlaşma boyunca renk parametreleri incelendiğinde L^* aydınlık değerinde azalma, yeşil tonu belirten negatif a değerlerinde azalma ve sarı tonu belirten pozitif b değerlerinde artış olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak örneklerin depolama süresince aydınlık ve yeşil ton değerlerinde önemli farklılık olduğu ($P<0.05$), ve sarı tonlarındaki değişim ise 15 nolu peynir örneği hariç diğer örneklerde önemlilik arz etmiştir ($P<0.05$). Konya küflü peynir bulamacı ilavesi peynirde aydınlık değerlerinde azalma, yeşil ve sarı tonda artma olmuştur. Sıcaklığın sarı ton üzerindeki artışı etkili olmuş, bu artış düşük depolama sıcaklığında az gerçekleşmiştir.

Azot Fraksiyonları, Serbest Amino Asit Değerleri ve Amino Asit Kompozisyonu

Peynirlerde proteolizin ne ölçüde olduğunu, mevcut azotun ne kadarının parçalandığını ve ne kadarının yeni ürüne dönüştüğüne etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizlerde; sıcaklık ve özellikle Konya küflü peynir bulamacının ilavesinin önemli etkisinin olduğu saptanmıştır. Olgunlaşmanın 1. günü aynı değerlerde olan suda çözünen azot ve % 12'lik TCA'da çözünen azot oranlarında olgunlaşma boyunca artış olmuş ve önemli derecede farklılıklar göstermiştir ($P<0.05$). Özellikle %3'lük bulamaç ilavesinin 5 °C'lik sıcaklık farkını 30 günlük olgunlaşma süresi içerisinde aynı seviyelere gelmesi ve hatta daha ileri seviyelere ulaşmıştır. Başlangıçta ortalama %0.18 suda çözünür azot ve %0.04 TCA oranları

%5'lik bulamaç katkısıyla sırasıyla %1.00 ve %0.36 değerlerine ulaşmıştır. Proteoliz seviyesinin artması Konya küflü peynirinin proteolitik etkisinden kaynaklanmaktadır. Peynirlerdeki proteolizi takip etmek için olgunluk çevresi ve olgunlaşma derinliği kavramlarından yararlanılabilir. Suda çözünen azotun toplam azot oranına “olgunlaşma çevresi” denmektedir. Olgunlaşma çevresi bir dereceye kadar kazeinin ne kadar değişime uğradığını gösterir. Olgunlaşma derinliği ise parçalanma sonucunda oluşan amino asitler ve amonyakın toplam azota oranı olarak tanımlanır. %12'lik TCA'da çözünen azot ve protein olmayan azot miktarları peynirlerde proteinlerin son parçalanma ürünleri olan küçük peptit ve amino asitleri içermektedir. Bu nedenle suda çözünen azot oranına göre %12'lik TCA'da çözünen azot oranının 30. günden itibaren oransal artışı daha fazla olmuştur.

Peynirlerin serbest amino asit miktarları bulamaç ilavesinden dolayı olgunlaşma süresince artış göstermiş ve peynir örneklerinde önemli düzeyde farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). Olgunlaşmanın 1. gününde tespit edilen serbest amino asit miktarındaki farklılığın katkısı yapılan Konya küflü peynir bulamacından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak olgunlaşmanın ilerlemesi ile bu farkın daha belirgin olduğu görülmektedir. Bulamaç ilavesi ile olgunlaşmanın 30. gününden itibaren yaklaşık 3 kat fazla birikime ulaşılmıştır. Konya küflü peynir bulamacının proteolitik etkisi ile özellikle amino asit katabolizmasına olan etkisi belirgin olduğu, amino asit miktarında da artışa neden olduğu görülmektedir. Bu artışın büyük çoğunluğu hidrofobik özellik gösteren amino asitlerde gerçekleşmiştir. Peynir örneklerinde en çok bulunan amino asitlerin sırasıyla miktarda Leu, Ala, Val, Phe, Ile, Trp, Lys, Gla ve Gly olmuştur. Bu aminoasitlerden Trp ve Lys miktarca kontrol örneğinde daha fazla bulunurken diğer amino asitler miktarca bulamaç ilaveli örneklerde daha fazla olmuştur. Belirtilen amino asitler haricinde His dışında diğerleri bütün örneklerde yakın miktarlarda olduğu, miktar olarak His ise bulamaç ilaveli peynirlerde azalmış ve hatta 28 nolu örnekte 60. gün tespit edilememiştir.

Ure-PAGE Elektroforetik Analizler

Olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerinde peynirlerin suda çözünmeyen kazein fraksiyonlarının elektroforetik özellikleri çıkarılmıştır. α_{s1} -Kazeinin parçalanması β -kazeine göre daha hızlı olduğu ve olgunlaşmanın 60. gününde parçalanma düzeyinin hızla arttığı görülmektedir. β -Kazein ve γ -kazeinlerin parçalanma hızları mobilite, yük ve molekül ağırlıkları ile açıklanabilir. Olgunlaşma süresi ilerledikçe bulamaç ilavesi daha fazla olan peynirlerde (27 ve 28 nolu peynir örneklerinde) α_{s1} -kazeinin parçalanması daha belirgin

görülmesi, bulamacın primer proteoliz seviyesine daha fazla katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır.

RP-HPLC peptit profilleri

Peynirlerde sekonder proteoliz hakkında bilgi edinmek için yapılan bu analizde kromatogramlardaki pik sayısı, yüksekliği ve alanı ile hidrofilik veya hidrofobik bölgede olmasına bakılmıştır. Olgunlaşmanın 1, 15, 30 ve 60. günlerine ait peynirlerin %70 etanolde çözünen ve çözünmeyen alt fraksiyonlarının RP-HPLC peptit profilleri belirlenmiştir. EtOH-sol fraksiyonları olgunlaşma süresi ilerledikçe kromatogramlarda piklerin sayısında ve yüksekliğinde artış olmuştur. Özellikle 27 ve 28 nolu örneklerde olgunlaşmanın 60. gününe ait serbest amino asit miktarındaki artıştan kaynaklı pik yüksekliklerinde azalma meydana gelmiştir. Alıkonma sürelerine göre piklerin farklılığı peynirler arasında farklı peptit içeriklerini ortaya koymuştur. 15. gün 27 ve 28 nolu örneklerin kromatogramlarındaki benzerlik net olarak görülmeye başlanmıştır. 28 nolu örnekte ileri proteolizden dolayı olgunlaşmanın 60. gün konsantrasyonlarda azalma gözlemlenmiştir. Özellikle 25, 27 ve 28 nolu örneklerde 15. gün sıcaklığın etkisiyle pik sayılarında artış olmuştur. Olgunlaşmanın 30. gününde bulamaç ihtiva eden 15, 27 ve 28 nolu örnekler benzer pik kromatogramları vermiştir. Depolama sıcaklığının da piklerin oluşumunda olgunlaşma süresine ve pik yüksekliklerine etkisinin olduğu da görülmektedir. Çünkü düşük depolama sıcaklığındaki 15 nolu örnek daha uzun sürede ve düşük seviyede pikler vermiştir. Olgunlaşmanın 1. gününde alıkonma süresinin 12, 14, 23, 34 ve 36. dakikasında görülen pik varlıklarının farklı peynirlerde ve farklı sürelerde oluşması ve olgunlaşmanın ilerlemesi ile pik yüksekliklerinin artması veya yıkımı ile peynirlerin farklı peptit varlıklarını ve yoğunluklarını işaret etmiştir. Hidrofilik bölgenin 24. ve 26. dakikalardaki pikler sadece 25 nolu kontrol örneğinde görülmüştür.

Olgunlaşmanın 60. günü hidrofilik bölgeye bakıldığında tüm örneklerde pik konsantrasyonlarının artış gösterdiği ve ayrıca 25 ve 15 nolu örnekte yeni piklerin var olmaya başladığı belirgindir. EtOH-insol fraksiyonlarına bakıldığında olgunlaşma süresi boyunca bütün peynir örneklerinin hidrofilik bölgesinde önemli düzeyde pikler gelmemiştir. Çünkü EtOH-insol fraksiyonları daha yüksek ağırlıklı hidrofobik peptitlerden oluşmaktadır.

Antioksidan Kapasite

Model peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca antioksidan analizi iki farklı radikal bağlama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DPPH* ve ABTS*+ yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları olgunlaşma süresi ile antioksidan aktivitenin arttığını göstermiştir. Antioksidan aktivitesindeki artışın peynirlerin proteoliz düzeyleri, depolama sıcaklıkları, depolama süresi ve içerdikleri mikroflora farklılıklarından kaynaklanmıştır. ABTS*+ yönteminde olgunlaşma süresince peynir örneklerinin antioksidan kapasitelerinde artış olmuş ve istatistiksel olarak bu farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$). DPPH* yönteminde de anlamlı farklılıklar olsa da depolama sıcaklığın etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir. DPPH'ın ABTS'ye göre sınırlı çözünür ortama sahip olmasından dolayı olgunlaşma ile artış gösteren antioksidan özellik gösteren hidrofilik peptidlerin yorumlanmasında sınırlı olmuşlardır.

ACE-Inhibitör Aktivitesi

Olgunlaşma sıcaklığı ve süresinin etkili olduğu ACE-inhibitör aktivitesi üzerine Konya küflü peynir bulamacı ilavesinde etkili olduğu ve aktivitenin arttığı görülmektedir. ACE-inhibitör aktivitesindeki proteoliz seviyesinin belirli derecelere kadar etkili olduğu bilindiğinden bulamaç ilavesi ile proteoliz seviyesi ve hidrofobik amino asit miktarındaki artma olgunlaşmanın ilk aylarındaki 27 ve 28 nolu örnekteki yükselmeyi açıklamaktadır. 15 nolu örneğin 30. gün ulaştığı proteoliz seviyesi kontrol örneğine göre fazla olduğundan ACE-inhibitör aktivitesine olumlu katkı sağlamıştır. İstatistiksel olarak peynir örneklerinde olgunlaşma boyunca ölçülen ACE-inhibitör aktivite değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($P<0.05$).

Aminopeptidaz Enzim Aktivitesi

Konya küflü peynir bulamacı ilavesi ile model peynir ekstraktlarında aminopeptidaz enzim aktivitesinde artışlar sağladığı gözlenmiştir. Olgunlaşma boyunca 15 nolu peynir örneği hariç diğer model peynir örneklerinde aktivite ölçümleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Mikrobiyolojik Analizler

Olgunlaşma sürecinde 1, 15, 30 ve 60. günlerinde mikrobiyolojik analizi yapılmış ve bu kapsamda maya-küf sayıları belirlenmiştir. Olgunlaşma boyunca kontrol örneğinde herhangi bir maya küf gelişimi saptanmamıştır. Konya küflü peynir bulamacı kaynaklı küf varlığının ise diğer örneklerde olgunlaşma süresi boyunca vakum ambalaj ve düşük gelişim

sıcaklığından dolayı inhibe olduğu ve azalma eğilimi gösterdiğinden istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Peynirlerin GS-MS ile belirlenen uçucu bileşikleri

Peynirlerin uçucu aromatik bileşen profilinde olgunlaşma süresince meydana gelen değişimlere ilişkin, model peynir örneklerinde 1, 15, 30 ve 60. günlerde uçucu bileşenlerin belirlenmesine yönelik analizler sonucunda aldehit (3), alkoller (23), asitler (11) çeşitli bileşikler (18), esterler (29), ketonlar (13) ve terpenler (4) olmak üzere toplam 101 bileşen belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 60. günü belirlenen uçucu bileşikler 25, 15, 27 ve 28 nolu örneklerde sırasıyla 60, 73, 73 ve 70 adettir. Uçucu bileşiklerin sayısı ve miktarları, bulamaç ilave edilen peynirlerde kontrol örneğine göre daha fazla olmuştur. Özellikle alkol, asit, ester ve keton miktarlarında artış olmuştur. Olgunlaşma sıcaklığının etkisi çeşitli bileşikler ve aldehitler üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Konya küflü peynirinin uçucu bileşiklerde önemli derecede farklılık ve konsantrasyonlarında artış sağlamıştır. Alkol bileşiklerinden izopropil alkol, ethanol, 2-bütanol, 2-heptanol ve nonan-2-ol, asit bileşiklerinden valerik asit, pentanoik asit, 4-metil pentanoik asit, hekzanoik asit, oktanoik asit ve dekanolik asit, ester bileşiklerinden metil asetat, etil asetat, etil propanoat, metil bütirat, etil bütirat, propil bütirat, etil n-valerat, izobütil bütanoat, n-bütil, etil heksanoat, izobütil heksanoat, etil oktanoat ve etil 9-dekenoat ile keton bileşiklerinden 2-bütanon, 2-pentanon, 2-heptanon, 2-nonanon, 8-nonen-2-on ve 2-undekanon konsantrasyon olarak fazla bulunmuştur.

Duyusal Analizler

Model peynirlerin olgunlaşma süresince duyusal analizleri yapılmış ve aralarında daha iyi kıyaslama yapılabilmesi amacıyla puanlama aralığı (1-9) uzun tutulmuştur. Bu kapsamda; renk, kesit yüzey, yapı ve tekstür, tat, koku, yabancı tat, tuzluluk, süt tadı ve kokusu, olgunluk durumu ve genel kabul edilebilirlik özellikleri değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak panelistlerin peynirlerin duyusal test puanlarına bakıldığında olgunlaşma süresince duyusal parametreleri genel olarak kontrol peynir örneğine oranla düşük puanlar almıştır. Örneklerin kendi arasında ve olgunlaşma süresi boyunca çoğu parametrede farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Özellikle Konya küflü peynir bulamacından kaynaklanan koku, aroma ve hızlı olgunlaştırma ile uçucu bileşenlerinin artması 27 ve 28 nolu peynir örneklerinin panelist puanlamalarında olumsuz karşılık bulmuştur. Bunun en önemli nedeni ise belli bir yöreye ait ve o yöre insanlarınca tadı ve lezzeti beğenilen Konya küflü peynirinin kullanıldığı peynirlerdeki

duyusal analizlerin değerlendirmesinde panelistlerin yöresel lezzet algısının etkisinin olduğu söylenebilir. Ayrıca değerlendirme aralığının geniş olması ve her değerlendirmedeki standart sapmanın fazla olması kişisel algılardaki farkı da ortaya koymuştur. Ancak genel kabul edilebilirlik değerleri orta seviye ve üstü kabul gördüğünden bulamaç ilavesi ile tüketime sunulabilir ürün niteliği kazanmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada peynir bulamacının hızlı olgunlaşma ve proteoliz seviyesi üzerine olumlu etkisi gözlenmiştir. Aynı koşullarda model peynir üretiminde Konya küflü peynir bulamacı ilavesi ile model peynirin 60 günlük olgunlaşma sürecinde elde edilen olgunluk seviyesi 30 günde elde edilebilmiştir. Daha düşük depolama sıcaklığına rağmen kontrol örneğine kıyasla %3'lük bulamaç ilavesi ile bir ay sonunda aynı seviyelere ulaşılmıştır. Ayrıca, olgunlaşmanın ilerlemesi ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Üretimde proteoliz seviyesinde, serbest amino asit miktarı, amino asit kompozisyonu, bioaktif peptit, antioksidan kapasite, ACE-Inhibitör aktivitesi, aminopeptidaz enzim aktivitesi ve uçucu bileşiklere olan olumlu etkiler olmuştur. Bununla birlikte, biyoaktif peptid, uçucu bileşikler ve benzeri gibi biyoyararlanımına ilişkin daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Fakat lipolitik aktivite yüksek ve olumsuz duyuşsal sonuçlar elde edileceğinden depolama süresi mavi damarlı peynirlerin olgunlaşma süreleri kadar tutulmuş, uzatılmamıştır. Model peynir üretiminde küflü peynir bulamacı ilavesinin etkisinin araştırıldığı şu ana kadar en kapsamlı çalışma olmuştur. Aynı zamanda sadece mikrobiyal çalışmalar yapılan Konya Küflü peynirinde biyokimyasal analizlerinin yapıldığı ilk araştırma niteliğindedir. Özellikle bir yöre halkı tarafından sağlık bilinci ile sevilerek tüketilen Konya küflü peyniri farklı yörelerin dikkatini çekebilecektir. Tüketicinin arzu ettiği yönde ve tüketim kalitesinde üretim yapan gıda endüstrisi için geleneksel ürünlerin biyoyararlılığı ve yeni ürünleri geliştirme için örnek bir çalışma olarak kabul görecektir. Bu çalışmada peynir örneklerinde en yüksek proteoliz seviyesine, enzim ve ACE-i aktivite değerlerine %5'lik oranla en yüksek bulamaç ilavesi ile ulaşılmıştır. Besinsel değerlerdeki artıştan dolayı model peynirin biyoyararlılık seviyesine olumlu katkı sağlamıştır. İleri biyoaktiviteden kaynaklı 28 nolu peynir örneğindeki hızlı olgunlaşmanın duyuşsal özellikleri etkilediği görülmüştür. Peynir örneklerinin arasında genel kabul edilebilirlik açısından farklılık olmaması küflü peynir bulamacının kullanım imkânına işaret etmiştir. Olgunlaşma hızına olan katkısından dolayı ekonomik, farklı tat ve lezzetlerde yeni ürünlerin üretilmesinde yararlanılacak kaynaklardan biri olacaktır. Düşük bulamaç ilavesi oranı ve depolama sıcaklığı ile yüksek tuz oranı duyuşsal değerlerini iyileştirecektir. Sonuç olarak hızlı olgunlaşma ve biyoyararlığa olan olumlu katkısının olduğu anlaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S. T., Arvízu, S. M., CastañoTostado, E., Regalado-González, C., et al. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides. antilisterial activity and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *Int. Dairy J.*, 33 (2). 191-197.
- Abbas, H.M., El Sayed, N.H. and Khorshid, M.A. (1993). Improving the quality of fresh white soft cheese made from ultrafiltered milk. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 21. 249-255.
- Abdel Baky, A.A., El Neshewy, A., Rabie, A.M. and Farahat, S.M. (1982). Ripening in Cephalotyre Ras cheese slurries. *J. Dairy Res.*, 49. 337-341.
- Akalin, A.S. and Karaman, A.D. (2011). Influence of packaging systems on the biochemical characteristics and volatile compounds of industrially produced Turkish White Cheese. *J. Food Biochem.*, 35 (2). 663-680.
- Alewijn, M., Sliwinski, E. L. and Wouters, J. T. M. (2005). Production of fat derived (flavor) compounds during the ripening of Gouda cheese. *Int. Dairy J.*, 15 (6). 733-740.
- Aluko, R.E. (2017). Structural characteristics of food protein-derived bitter peptides. In: *Bitterness: Perception, Chemistry and Food Processing*, Aliani, A., Eskin, M.N.A. (eds.), 1st Edition, The Institute of Food Technologists Press, the UK, pp. 105-129.
- Al-Otaibi, M.M. and Wilbey, R.A. (2004). Effect of temperature and salt on the maturation of white salted cheese. *Int. J. Dairy Technol.*, 57(1). 57-63.
- And, J. T. and Nielsen, P. V. (2005). Electronic nose technology in quality assessment: Monitoring the ripening process of Danish blue cheese. *J. Food Sci.*, 70(1). 44-49.
- Andiç, S., Tunçtürk, Y. and Boran, G. (2014). Changes in volatile compounds of cheese. Processing and impact on active components in food. 231-239.
- Andrews, A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.*, 50. 240-246.
- Anonymous. (2016). Global market review of functional foods-Forecasts to 2010. www.marketresearch.com (online Access on 30 November. 2016)
- Anonymous. (2014) <https://konya.tarimorman.gov.tr/Sayfalar/EN/Detay.aspx?OgeId=58&Liste=Haber>
- AOAC (1990). Official methods of analysis (15. Edition). Washington. DC: Association of Official Analytical Chemists
- AOAC (1995). Official Methods of Analysis (16. Edition). Arlington: Association of Official Analytical Chemists AOAC no. 920.124.
- Ardağ, A. (2008). Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 54s.

- Ardö, Y. and Polychroniadou, A. (1999). Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese. Luxembourg: COST 95.
- Argumosa, O.G., Carballo, J., Bernardo, A. and Marin, R. (1992). Chemical Characterisation of Spanish Artisanal Goat Cheese (Babia-Laciana Variety). *Microbiol. Aliment. Nutr.*, 10:69-79.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Tech.*, 11 (11). 419- 421.
- Arora, G. and Lee, B.H. (1994). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* S93. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 19. 179-192.
- Aryee, A.N.A., Agyei, D., Udenigwe, C.C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In: *Proteins in Food Processing*, Yada, R.Y. (ed.), 2nd Edition, Woodhead Publishing, the UK, pp. 60-89.
- Atasoy, A. F., Hayaloglu, A.A., Kirmaci, H.A., Levent, O. and Turkoglu, H. (2013). Effects of partial substitution of caprine for ovine milk on the volatile compounds of fresh and mature Urfa cheeses. *Small Rumin. Res.*, 115 (1-3). 113-123.
- Ayağ, N. (2017). Beyaz. Kaşar ve Tulum Peynirlerinin Gama Aminobütirik Asit (GABA) İçeriği İle Serbest Amino Asit Profillerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Ayar, A., Akın, N. and Sert, D. (2006). Bazı Peynir Çeşitlerinin Mineral Kompozisyonu ve Beslenme Yönünden Önemi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiri Kitabı*.s 319-322. 24-26 Mayıs. Bolu.
- Azarnia, S., Lee, B., St-Gelais, D., Kilcawley, K. and Noroozi, E. (2011). Effect of free and encapsulated recombinant aminopeptidase on proteolytic indices and sensory characteristics of Cheddar cheese. *LWT*.44. 570-575.
- Baankreis, R. and Exterkate, F. (1991). Characterisation of a Peptidase from *Lactococcus lactis* ssp* *cremoris* HP that Hydrolyses Di- and Tripeptides Containing Proline or Hydrophobic Residues as the Aminoterminal Amino Acid. *Syst. App. Microbiol.*, 14:317- 323.
- Bas, D., Kendirci, P., Salum, P., Govce, G. and Erbay, Z. (2019). Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: I-effects of proteolytic enzymes and determination of their appropriate combination. *Food Bioprod. Process.*, 117, 287-301.
- Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins. cecropins. melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.*, 156 (3). 197–211.
- Bertuzzi, A.S., McSweeney, P.L.H., Rea, M.C. and Kilcawley, K.N. (2018). Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 17. 371-390.
- Bezerra, T.K.A., Arcanjo, N.M.O., Araújo, A.R.R., Queiroz, A.L.M., Oliveira, M.E.G., Gomes, A.M.P. and Madruga, M.S. (2017). Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT.*, 76. Part B. 209-215.
- Bhopale, G.M. (2016). Bovine milk derived peptides: A comprehensive review. *Eur J Pharm Med Res*, 3(3): 167–170, ISSN: 3294-3211.

- Blakesley, R.W. and Boezi, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal Biochem.*, 82. 580-581.
- Bonaiti, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E. and Engel, E. (2005). An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *J. Dairy Sci.*, 88. 1671–1684.
- Bosset, J.O. and Gauch, R. (1993). Comparison of the volatile flavour compounds of six European ‘AOC’cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *Int. Dairy J.*, 3. 359–77.
- Bottesini, C. Paoletta, S., Lambertini, F., Galavera, G. Tedeschi, T., Dossena, A., Marchelli, R. and Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 64. 953-958.
- Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E. and Vines, B.K. (1993). Chemical and physical methods. “in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*”. Eds: Wehr M and Frank J. APHA. Washington. 433- 531.
- Branciari, R., Ranucci, D., Trabalza-Marinucci, M., Codini, M., Orru, M., Ortenzi, R. and Valiani, A. (2015). Evaluation of the antioxidant properties and oxidative stability of Pecorino cheese made from the raw milk of ewes fed *Rosmarinus officinalis* L. Leaves. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 50. 558-565.
- Buffa, M.N., Trujillo, A.J., Pavia, M. and Guamis, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and color characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats’ milk. *Int. Dairy J.*, 11. 927-934.
- Butikofer, U., Meyer, J., Sieber, R. and Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tri-peptides Val-Pro-Pro and Ile-ProPro in hard, semi-hard and soft cheeses. *Int. Dairy J.*, 17 (8). 968-975.
- Butikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B. and Wechsler, D. (2008). Occurrence of the angiotension-converting enzyme-inhibiting tri-peptides Val-Pro-Pro and IlePro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J. Dairy Sci.*, 91 (1). 29-38.
- Cakir, Y., Cakmakci, S. and Hayaloglu, A.A. (2016). The effect of addition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and ripening period on proteolysis, sensory properties and volatile profiles of Erzincan Tulum (Savak) cheese made from raw Akkaraman sheep's milk. *Small Rumin. Res.*, 134. 65-73.
- Cakmakci, S., Dagdemir, E., Hayaloglu, A. A., Gurses, M., Cetin, B., and Tahmas-Kahyaoglu, D. (2013). Effect of *Penicillium roqueforti* and incorporation of whey cheese on volatile profiles and sensory characteristics of mould-ripened Civil cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 66. 512–526.
- Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P. and Nuñez, M. (2014). Effect of HighPressure Processing on the Microbiology, Proteolysis, Biogenic Amines and Flavour of Cheese Made from Unpasteurized Milk. *Food Bioprocess Technol.*, 8 (2). 319-332.
- Cantor, M.D., Van den Temple, T., Hansen, T.K. and Ardo, Y. (2004). Blue cheese. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1, Elsevier, London, UK. 175-178.
- Casey, J. and Dobb, R. (1992). Microbial routes to aromatic aldehydes. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14:739.

- Castada, H. Z., James Harper, W. and Barringer, S.A. (2015). Volatile organic compounds of a Swiss cheese slurry system with and without added reduced glutathione. compared with commercial Swiss cheese. *Int. Dairy J.*, 49. 72-77.
- Castada, H.Z., Wick, C., Taylor, K. and Harper, W.J. (2014). Analysis of Selected Volatile Organic Compounds in Split and Nonsplit Swiss Cheese Samples Using Selected-Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS). *J. Food Sci.*, 79 (4). 489-498.
- Castro, M.A.M. and Martin-Hernandez, M.C. (1994). Determination of aminopeptidase activity in cheese. *Eur. Food Res. Technol.*, 198. 20-23.
- Cerning, J., Gripon, J.C., Lamberet, G. and Lenoir, J. (1987) *Lait* 67(1):3-39.
- Ceruti, R.J., Zorrilla, S.E. and Sihufe, G.A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggiano cheese. *Food Res. Int.*, 48, 34-40.
- Ceruti, R.J., Pirola, M.B., Ramos, E., Robert, L., Rubiolo, A.C. and Sihufe, G.A. (2016). Use of an exogenous carboxypeptidase to accelerate proteolysis in reggiano cheese. *Czech J. Food Sci.* 34 (5): 445-455.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P. and Fiat, A.M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie.* 80 (2). 155- 165.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agr. Food Chem.*, 44. 2619-2623.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A. and Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *Int J Dairy Technol*, 65(1): 1-12.
- Cholet, O., Henaut, A., Hebert, A. and Bonnarme, P. (2008). Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol* 74 (11). 3356-3367.
- Chudy, S. and Gierałtowska, U. (2020). Influence of the background color on the cheese color parameters. *Int.J.Dairy Sci.* 15 (2). 108-113.
- Chudy S., Bilska A., Kowalski R. and Teichert J. (2020). Colour of milk and milk products in CIE L*a*b* space. *Med. Weter.*, 76 (2). 77-81.
- Cinbaş, T. and Kılıç, M. (2006). Proteolysis and lipolysis in white cheeses manufactured by two different production methods. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41. 530-537.
- Clare, D. A. and Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides a prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83 (6). 1187-1195.
- Clark, S., Costello, M., Drake, M.A. and Bodyfelt, F. (2009). The sensory evaluation of dairy products. *The Sensory Evaluation of Dairy Products*
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. and Wilkinson, M. G. (2003a). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 13 (11). 841-866.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. and Wilkinson, M. G. (2003b). Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 70 (01). 105-113
- Corrêa Lelles Nogueira, M., Lubachevsky, G. and Rankin, S.A. (2005). A study of the volatile composition of Minas cheese. *LWT.* 38. 555-563

- Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Coelho, J., Meira, S.M., Lopes, F.C., Segalin, J. and Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J. Sci. Food Agr.*, 91 (12). 2247-2254.
- Corrêa, A.P.F., Daroit, D., Fontoura, J. 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.
- Corsetti, A., Gobetti, M., Smacchi, E., Andgelis, M. de Rossi, J. (1998). Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. *J. Dairy Res.*, 65. 631-642.
- Curioni, P. M. G., and Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.*, 12. 959–984.
- da Silva, D.F., Hirschberg, C., Ahrné, L., Hougaard, A.B. and Ipsen, R. (2018). Cheese feed to powder: effects of cheese age, added dairy ingredients and spray drying temperature on properties of cheese powders. *J. Food Eng.*, 237. 215-225.
- Dağdemir, E. (2001). Salamura Beyaz Peynir Üretiminde Farklı Starter Kültür Kullanımının Peynir Kalitesi Üzerine Etkisi. A.Ü. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum 73s.
- Daliri, E.B-M., Oh, D.H., Lee, B.H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5): 32.
- Dako, E., El Soda, M., Vuillemand, J.C. and Simard, R. E. (1995). Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, 28.503-509.
- Dave, R.I., McMahon, D.J., Oberg, C.J., and Broadbent, J.R. (2003). Influence of Coagulant Level on Proteolysis and Functionality of Mozzarella Cheeses Made Using Direct Acidification. *J.Dairy Sci.* 86 (1): 114-126.
- De Belie, N., Pedersen, D. K., Martens, M., Bro, R., Munck, L. and De Baerdemaeker, J. (2003). The use of visible and near-infrared reflectance measurements to assess sensory changes in carrot texture and sweetness during heat treatment. *Biosyst. Eng.*, 85(2). 213–225.
- De Frutos, M., Sanz, J. and Martinez-Castro, J. (1991). Characterization of artisanal cheeses by GC/MS analysis of their medium volatile (SDE) fraction. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 524-530.
- del Olmo, A., López-Pérez, O., Picon, A., Gaya, P. and Nuñez, M. (2019). Cheese supplementation with five species of edible seaweeds: Effect on proteolysis, lipolysis and volatile compounds. *Int. Dairy J.*, 90. 104-113.
- del Olmo, A., Picon, A. and Nuñez, M. (2018). Cheese supplementation with five species of edible seaweeds: Effect on microbiota, antioxidant activity, colour, texture and sensory characteristics. *Int. Dairy J.*, 84. 36-45.
- Demirci, M. (1990). Peynirin Beslenmedeki Yeri ve Önemi. *Gıda*. 15(5). 285-289.
- Diezhandino, I. Fernández, D., González, L., McSweeney, P.L.H. and Fresno, J.M. (2015). Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). *Food Chem.*, 168: 134-141.
- Diezhandino, I., Fernández, D., Sacristán, N., Combarros-Fuertes, P., Prieto, B. and Fresno, J.M. (2016). Rheological, textural, colour and sensory characteristics of a Spanish blue cheese (Valdeón cheese). *LWT.*, 65,1118-1125.

- Dinç, M. (2011). Natamisin. *Gıda ve Yem Analiz* 35(9): 16-19.
- Ding, T.Y., Sang, G.W., Jin, Z. and Harper, W.J. (2001). High pressure treatment of Swiss cheese slurries (I): Inactivation of selected microorganisms after treatment and during accelerated ripening. *J. Zhejiang University (Science)* 2 (2). 204-208.
- Drake, M. A. and Civille, G. V. (2003). Flavor lexicons. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2(1). 33-40.
- Drake, M. A. and Delahunty, C. M. (2017). Chapter 20 - Sensory Character of Cheese and its Evaluation (4. Edition).
- Dufosse L., Galaup, P., Carlet, E., Flamin, C. and Valla, A. (2005). Spectrocolorimetry in the CIE L*a*b* color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. *Food Res. Int.* 38. 919-924.
- Dulley, J.R. (1976). The utilisation of cheese slurries to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 31. 143-147.
- El Sayed, N.H., Abbas, H.M., Ahmed, N.S. (1993). Cheese slurry in the acceleration of Domiati cheese ripening. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 21. 151-159.
- El Sisi, M.G.M. (2002). Utilization of Blue cheese slurry for accelerated ripening of Domiati cheese. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 30. 83-99.
- El Sisi, M.G.M. (2003). Effect of brining on quality of accelerated ripening of Ras cheese made from buffaloes milk. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 31. 305-317
- El Soda, M. (2002). CHEESE | Accelerated Cheese Ripening. *Encyclopedia Dairy Sci.*, 327-329
- El Soda, M., (1995). Acceleration of flavour formation during cheese ripening. G. Charalambous (Ed.). *Food Flavors: Generation. Analysis and Process Influence.* 721-746
- Epand, R. C. and Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *BBA-Biomembranes.* 1462 (1). 11-28
- Erdmann, K., Cheung, B. W. and Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.*, 9 (10). 643-654
- Evert-Arriagada, K., Hernandez-Herrero, M.M., Gallardo-Chacon, J.J., Juan, B. and Trujillo, A.J. (2013). Effect of high pressure processing on volatile compound profile of a starter-free fresh cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 19. 73-78.
- Fairclough, A.C., Cliffe, D.E. and Knapper, S. (2011). Factors affecting *Penicillium roqueforti* (*Penicillium glaucum*) in internally mould ripened cheeses: implications for pre-packed blue cheeses. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46. 1586-1590.
- Farkye, N. Y. (2004). "Cheese Technology". *Int. J. Dairy Technol.* 57(2). 91-98
- Fenelon, M.A., Ryan, M.P., Rea, M.C., Guinee, T.P., Ross, R.P., Hill, C. and Harrington, D. (1999). Elevated temperature ripening of reduced fat cheddar cheese made with or without lactacin 3147-producing starter culture. *J. Dairy Sci.*, 82(1): 10-22
- Ferreira, I., Pinho, O. and Sa Mpaio, P., (2009). Volatile fraction of DOP "Castelo Branco" cheese: Influence of breed. *Food Chem.* 112 (4). 1053-1059.

- Fitz-Gerald, R. J. and Meisel, H. (2000). Milk proteinderived peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Br J Nutr*, 84(1): 33-37.
- Fitz Gerald, R. J. and Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.*, 59 (2). 118-125.
- Forde, A. and Fitz-Gerald, G. F. (2000). Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavor., *Curr. Opin. Biotech.*, 11 (5). 484-489
- Fox, P. F. and Law, J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*, 5 (3). 239-262
- Fox, P. F., Law, J., Mcsweeney, P.H.L., and Wallace, J. (1993). Biochemistry of Cheese Ripening. (P.F. Fox, editor). *Cheese: Chemistry. Physics and Microbiology*. 2nd Edn., General Aspects. Vol. 1. Chapman and Hall. London. pp: 389-438
- Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J. and Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70:271-297
- Froetschel, M. A. (1996). Bioactive peptides in digesta that regulate gastrointestinal function and intake. *J. Anim. Sci.*, 74 (10). 2500-2508
- Fuchsmann, P., Stern, M.T., Brugger, Y.A. and Breme, K. (2015). Olfactometry Profiles and Quantitation of Volatile Sulfur Compounds of Swiss Tilsit Cheeses. *J. Agr. Food Chem.*, 63 (34). 7511-7521.
- Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson, D. and Nyborg, C.B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin-converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 83: 27-34.
- Gallois, A. and Langlois, D. (1990). New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Lait*, 70, 89-106.
- Ganesan, B. and Weimer, B. C. (2017). Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes. 2017. Biochemistry of cheese ripening: proteolysis. In: P. L. H. Mcsweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter. & D. W. Everett. editors. *Cheese: chemistry. physics. and microbiology*. 4th ed. San Diego: Academic Press. 483–516.
- Garbowska, M., Pluta, A. and Berthold-Pluta, A. (2020). Proteolytic and ACE-inhibitory activities of Dutch-type cheese models prepared with different strains of *Lactococcus lactis*. *Food Biosci.*, 35. 100604.
- Gaucel, S., Guillemin, H. and Corrieu, G. (2012). A generalised model for cheese mass loss determination during ripening. *J. Food Eng.* 110.1.,109-116.
- Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzenatakis, N. (2003). Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek Island Sifnas. *Int. Dairy J. Technol.*, 52: 117-122.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Cagno, D. R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42. 223-239.
- Gomez, R., Peláez, C. and Martín-Hernández (1988) Enzyme activity in Spanish goat's cheeses. *Food Chem.*, 28:159–165.
- Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M. and Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J*, 12: 697-706.

- González-González, C.R., Machado, J., Correia, S., McCartney, A.L., Stephen Elmore, J. and Jauregi, P. (2019). Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *LWT*, 111, 449– 456.
- Göncü, A. and AlpKent, Z. (2005). Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. *Int. Dairy J.*, 15, 771-776.
- Gripon, J. C. (1993). Mould-ripened cheeses. In P. F. Fox, *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Vol. 2 (pp. 111–136). London: Chapman & Hall
- Guichard, E., Berdague, J. and Grappin, R. (1987). Affinage et qualite du 'Gruyere de Comt'e. Influence de l'affinage sur la teneur en compos'es' volatils. *Lait*. 67. 319–328.
- Guizani, N., Attabi, Z.A., Kasapis, S. and Gaafar, O.M. (2006). Ripening profile of semi-hard standard goat cheese made from pasteurized milk. *Int. J. Food Prop.*, 9(3): 523-532.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R. and Sangwan, R.B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 62, 339-347.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R. and Sangwan, R.B. (2013). ACE-inhibitory activity of cheddar cheeses made with adjunct cultures at different stages of ripening. *Adv. Dairy Res.*, 1, 102.
- Gün, İ. (2012). Alternatif Kılıf Uygulamalarının Tulum Peynirinin Bazı Nitelikleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta
- Gürsoy, O. (2005). Bazı probiyotik bakterilerin destek kültür olarak beyaz peynir üretiminde kullanımı. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir
- Haenlein, G.F.W., and Caccese, R. (1984). Goat milk versus cow milk (pp: 1-4). In: Haenlein, G. F. W., Ace. D.L. (Ed.). *Extension Goat Handbook*. USDA Published Washington. D. C., E-1
- Hajj, E., Yaacoub, R., Al-Arja, N., Scandar, S., Dib, H. (2019). Development of a culture-ripened semi-hard Kishk-cheese containing Bourghol or Semolina. *J Food Res*. 8(1): 21-31.
- Hambræus, L. (1992). *Advanced dairy chemistry-1: Proteins: Nutritional aspects of milk proteins*. Ed. 2. Editor: Fox, P. F., Elsevier Applied Science. London. 457-490.
- Hannon, J. A., Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Delahunty, C. M. and Beresford, T. P. (2004). Effect of addition of enzyme-modified cheese on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. Poster presentation. IDF symposium. Prague. March 2004.
- Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A. and Beresford, T.P. (2003). Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 13: 313-323.
- Haque, E., Chand, R. and Kapila, S. (2008). Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Rev. Int.*, 25 (1). 28-43.
- Hartmann, R. and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotech.*, 18 (2). 163–169.

- Hayaloglu, A. A., Cakmakci, S., Brechany, E. Y., Deegan, K. C., Mcsweeney, P. L. H., (2006). Microbiology. biochemistry. and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *J. Dairy Sci.*, 90: 1102-1121.
- Hayaloglu, A.A. (2009). Volatile composition and proteolysis in traditionally produced mature Kashar cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44. 1388-1394.
- Hayaloglu, A.A., Güven, M., Fox, P.F., Hannon, J.A. and Mcsweeney, P.L.H. (2004). Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined Strains of *Lactococcus*. *Int. Dairy J.*, 14: 509-610.
- Hayaloglu, A. A. and Sahingil, D. (2016). Model peynirde biyoaktif peptit Oluşumunun Araştırılması ve peptitlerin MALDI-ToF-MS ile Tanımlanması Project Report. Ankara. Turkey: TUBITAK
- Hayaloglu, A.A and Kirbag, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 115. 376-380.
- Hayaloglu, A.A. (2003). Starter Olarak Kullanılan Bazı *Lactococcus* Suşlarının Beyaz peynirlerin Özellikleri Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Adana. 170 s.
- Hayaloglu, A.A. (2007). Comparison of different single-strainstarter cultures for their effects on ripening and grading of Beyaz cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 42. 930-938.
- Hayaloglu, A.A. and Brechany, E.Y. (2007). Influence of milk pasteurization and scalding temperature on the volatile compounds of Malatya. a farmhouse Halloumi-type cheese. *Lait*. 87: 39-57.
- Hayaloglu, A.A. and Karabulut, I. (2013). SPME/GC-MS characterization and comparison of volatiles of eleven varieties of Turkish cheeses. *Int. J. Food Prop.*, 16 (7). 1630-1653.
- Hayaloglu, A.A. and Özer, B. (2011) Peynir Biliminin Temelleri. Sidaş Yayıncılık
- Hayaloglu, A.A., Brechany, E.Y., Deegan, K.C. and Mcsweeney, P.L.H. (2008). Characterization of the chemistry. biochemistry and volatile profile of Kuflu cheese. a mould-ripened variety. *LWT.*, 41:1323–1334.
- Hayaloglu, A.A., Karagül-Yüceer, Y. ve Avşar, Y.K. (2011b). Peynirde aroma. Peynir biliminin temelleri. Ed: Hayaloğlu AA. Özer B. İzmir. 263-301.
- Hayaloglu, A.A., Şahingil, D., Gökçe, Y. ve Çelikkıçak, Ö. (2015) TÜBİTAK Destekli Projeler Proje No:213O131. Proje Adı: Model Peynirde Biyoaktif Peptit Oluşumunun Araştırılması ve Peptitlerin MALDI-ToF-MS ile Tanımlanması. Başlama ve Bitiş Tarihi: 15/03/2014-2015
- Hayaloglu, A.A., Topcu, A. and Koca, N. (2011a). Peynir analizleri. Peynir biliminin temelleri. Ed: Hayaloğlu AA. Özer B. İzmir. 489-562.
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation. cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnol. J.*, 2 (4). 435-449.
- Hayes, M. and Tiwari, B.K. (2015). Bioactive carbohydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 22485- 22508.

- Hernández, I., Barron, L. J. R., Virto, M., Perez-Elortondo, F. J., Flanagan, C., Rozas, U., Najera, A. I., Albisu, M., Vicente, M. S. and De Renobales, M. (2009). Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. *Food Chem.*, 116 (1). 158-166.
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-Castillo, M., Picque, D., Spinnler, H.E. and Martín del Campo, S.T. (2017). Actividad antioxidante e inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina en queso fresco de Cabra preparado sin cultivos iniciadores: Estudio preliminar. *CyTA J. Food.*, 15 (1), 49–57.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M. and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Coll Interfac*, 165: 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 52 (6). 1504-1510.
- Hickey, C.D., Auty, M.A.E., Wilkinson, M.G. and Sheehan, J.J. (2015). The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends Food Sci Technol*, 41, 135-148.
- Huang, D. B. and Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856.
- IDF (1982). Cheese and processed cheese-determination of the total solid content. IDF Standard 4A. Brussels. Belgium: International Dairy Federation
- IDF (1993). Milk. Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content. IDF Standard 20B. Brussels. Belgium: International Dairy Federation.
- Iriyogen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M. and Torre, P. (2007). Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewes-milk cheese. *Food Chem.*, 100: 71-80.
- Ismail, A. A., and Hansen, K. (1972). Accumulation of free amino acids during cheese ripening of some types of Danish cheeses. *Milchwissenschaft* 27:9.
- Izco, J.M. and Torre, P. (2000) Characterization of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analyzed by GC-MS. *Food Chem.*, 70. 409-417.
- Joosten, H.M.L.J. (1988). Conditions Allowing the Formation of Biogenic Amines in Cheese. 3. Factors Influencing the Amounts Formed. *Neth. Milk Dairy J.*, 41(4). 329-357.
- Kamaly, K. M., and Marth, E. H. (1989). Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: A review. *J. Dairy Sci.*, 72:1945–1966.
- Kandarakis, I., Moatsou, G., Georgala, A.I.K., Kaminarides, S. and Anifantakis, E. (2001). Effect of draining temperature on the biochemical characteristics of Feta cheese. *Food Chem.*, 72: 369-378.
- Karali, F., Georgala, A., Massouras, T. and Kaminarides, S. (2013). Volatile compounds and lipolysis levels of Kopanisti, a traditional Greek raw milk cheese. *J. Sci. Food Agric.*, 93 (8). 1845-1851.

- Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M. and Farag, M.A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement. process acceleration and improved quality assessment. *Trends Food Sci. Technol.*, 88. 343-360.
- Kınık, Ö. ve Gürsoy, O. (2002). Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. *Pamukkale Üniv. Müh. Bilim. Derg.*, 8 (2). 195-203.
- Kırmacı, H.A., Hayaloglu, A.A., Özer, B., Akçelik, M. and Akkoc, N. (2011). Proteolytic properties of Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) made by using wild-type Lactococcal strains. *Int. J. Dairy Technol.*, 64(3): 394-401.
- Kilcawley, K. N. (2017). Cheese flavour. In: P. F. Fox, T. P. Guinee. T. M. Cogan. and P. L. H. Mcsweeney, editors. *Fundamentals of cheese science*. New York: Springer. pp 443–474.
- Kilcawley, K. N., Ngoniema, A. B., Hannon, J. A., Doolan, I. A. and Wilkinson, M. G. (2012). Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 26. 50-57.
- Kirst, E. (2002). Cheese ripening changes in milk fat and the development of aroma components. *DMZ. Lebensmittelindustrie-und-Milchwirtschaft.*, 123(9). 36-42.
- Kitts, D. D. and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Design.*, 9 (16). 1309-1323.
- Koçak, A., Şanlı, T., Anlı, E. A. and Hayaloglu, A.A. (2020). Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in whitebrined goat-milk cheese. *LWT.*, 123. 109127.
- Korhonen, H. and Pihlanto-Leppälä, A. (2004). Milk derived bioactive peptides: formation and prospects for health promotion (pp: 109-124). In: Short. C., O'Brien J. (Ed.). *Handbook of Functional Dairy Products*. CRC Pres. Boca Raton. FL.
- Korhonen, H. J. (2009). Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Aust. J. Dairy Technol.*, 64 (1). 16-25.
- Korhonen, H. J. and Pihlanto-Leppälä, A. (2003). Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Aust. J. Dairy Technol.*, 58 (2). 129-134.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications, *J Funct Foods*, 1(2): 177-187.
- Korhonen, H. J., and Pihlanto-Leppälä, A. (2006). Bioactive peptides. production and functionality. *Int. Dairy J.*, 16 (9). 945-960.
- Korös, Á., Varga, Z., and Molnár-Perl, I. (2008). Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1203 (2) 146-152.
- Kristofferson, T., Mikolajcik, E.M. and Gould, I.A. (1967). Cheddar cheese flavor. IV. directed and accelerated ripening process. *J. Dairy Sci.*, 50. 292-297.
- Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. 37. 331–335.
- Kurćubić, V.S., Vujić, J.M., Ilić, M.D., Vranić, D., Vesković-Moračanin, S.M. and Mašković, P.Z. (2015). Effect of plant extracts *Kitaibeli avitifolia* on antioxidant

- activity, chemical characteristics, microbiological status and sensory properties of Pirotskikachkaval cheese. *HemijaskaIndust*, 69. 85-93.
- Law, B. A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *Int. Dairy J.*, 11 (4). 383-398.
- Law, J., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Fox, P.F. and Farkye, N.Y. (1992). Proteolysis and flavor development in cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. *J. Dairy Sci.*, 75: 1173-1185.
- Lawlor, J. B., Delahunty, C. M., Wilkinson, M. G. and Sheehan, J. (2002). Relationships between the gross. non-volatile and volatile compositions and the sensory attributes of eight hard-type cheeses. *Int. Dairy J.*, 12. 493–509.
- Lawlor, J. B., Delahunty, C. M., Wilkinson, M. G. and Sheehan, J. (2001). Relationships between the sensory characteristics. neutral volatile comparison and gross composition of ten varieties. *Lait.*, 81. 487–507.
- Lawlor, J.B., Delahunty, C.M., Sheehan, J. and Wilkinson, M.G. (2003). Relationships between sensory attributes and the volatile compounds, non-volatile and gross compositional constituents of six blue-type cheeses *Int. Dairy J.*, 13. 481-494.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K. and Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 70: 1748-1760.
- Leonil, J., Gagnaire, V., Mollé, D., Pezennec, S. and Bouhallab, S. (2000). Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A.*, 881 (1). 1-21.
- Levkov, V., Gad Ovska, S. Tuševski, O., Gjorgovska, N. and Mateva, N. (2014). Preliminary study of total phenolic content in traditional sheep cheese. *Maced. J. Anim. Sci.*, 4.31-35.
- Lignitto L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E. et al. (2010). Angiotensin-converting, enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. *Int Dairy J*, 20 (1):11-17.
- Liu, S-Q. Holland, R. and Crow, V.L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int. Dairy J.*, 14: 923-945.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Gomez, B., Barba, F.J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C. and Toldra, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends Food Sci. Technol.* 79, 136-147.
- Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D. and Floury, J. (2018). Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion. *Food Hydrocoll.* 82. 399-411
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Bio. Chem.*, 15. 265-275.
- Lucena, A.P.S., Nascimento, R.J.B., Maciel, J.A.C., Tavares, J.X., Barbosa.-Filho, J.M. and Oliveira, E.J. (2010). Antioxidant Activity and phenolics contents of selected Brazilian wines. *J. Food Compost. Anal.*, 23. 30-36.

- Lund, M. and Ardö, Y. (2004). Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe (III) affinity chromatography and mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, 52 (21). 6616-6622.
- Majcher, M.A., Goderska, K., Pikul, J. and Jelen, H.H. (2011). Changes in volatile. sensory and microbial profiles during preparation of smoked ewe cheese. *J. Sci. Food Agr.*, 91. 1416-1423.
- Mallatou, H., Pappa, E.C. and Boumba, A.V. (2004). Proteolysis in Teleme cheese made from ewes' goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. Greece. *Int. Dairy J.*, 14: 977-987.
- Mane, A., Ciocia, F., Beck, T.K., Lillevang, S.K. and Mcsweeney, P.L.H. (2019). Proteolysis in Danish blue cheese during ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 97: 191-200.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., Battelli, G., Vallone, L. and De Noni, I. (2017). Composition, proteolysis, and volatile profile of Strachitunt cheese. *J. Dairy Sci.* 100 (3), 1679 – 1687.
- Matera, J., Luna, A.S., Batista, D.B., Pimentel, T.C. Moraes, J., Kamimura, B.A., et al. (2018). Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Res. Int.*, 108,18-26.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y. and Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit. Rev. Food Sci.*, 49 (6). 577-606.
- McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 57(2/3): 127-144.
- Mcsweeney, P.L.H. (2011). Cheese: Biochemistry of cheese ripening. *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 667–674). (2nd ed.).
- Mcsweeney, P.L.H. and Fox, P. F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. *Cheese: chemistry. physics and microbiology: general aspects*. Vol. I. Editors: Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan. T. M. and Guinee. T. P., Elsevier Academic Press. London. 361-371.
- Mcsweeney, P.L.H. and Fox, P.F. (1997). Chemical methodsfor the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*. 41-76.
- Mcsweeney, P.L.H. and Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80: 293-324
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.*, 56:181-188.
- Mei, J., Guo, Q. Z., Wu, Y., Li, Y.F. and Yu, H.N. (2015). Study of proteolysis. lipolysis. and volatile compounds of a Camembert-type cheese manufactured using a freeze-dried Tibetan kefir co-culture during ripening. *Food Sci. Biotechnol.*, 24 (2). 393-402.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton. FL: CRC Press

- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S. and Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Res. Int.*, 48 (1). 322-329.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.*, 8 (5). 363- 373.
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*. 21 (1-4). 55-61.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.*, 12 (16). 1905-1919.
- Meisel, H. and Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *A. Van Leeuw. J. Microb.*, 76 (1-4). 207-215.
- Meisel, H., Goepfert, A. and Günther, S. (1997). ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*. 52. 307-310.
- Meng, F., Chen, R., Zhu, X., Lu, Y., Nie, T., Lu, F., Lu, Z. (2018). Newly effective milk-clotting enzyme from *Bacillus subtilis* and its application in cheese making. *J Agric Food Chem*, 66: 6162-6169.
- Milesi, M.M., Bergamini, C.V. and Hynes, E. (2011). Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Res. Int.*, 44. 765-773
- Moatsou, G., Kandarikis, I., Georgala, A.K., Alichanidis, E.S. and Anifantakis, E.M. (1999). Effect of Starters on Proteolysis of Greviera Kritis Cheese. *Lait.*, 79: 303-315.
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S. and Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - a review. *Saudi J. Biol. Sci*, 23 (5). 577-583.
- Moio, L, Piombino, P. and Addeo, F. (2000). Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.*, 67, 273-285.
- Molimard, P. and Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened heeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.*, 79(2). 169–184
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.*, 26(2). 211-219.
- Moreira, G.M.M., Costa, R.G.B., Teodoro, V.A.M., Paula, J.C.J., Sobral, D., Fernandes, C. and Gloria, M.B.A. (2018). Effect of ripening time on proteolysis. free amino acids. bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. *LWT.*, 98. 583-590.
- Mostafa, M.B.M., El Abbasy, M.Z. and Ismail, M.A. (2000). Utilization of cheese slurries to accelerate the ripening of UF cephalo type Ras cheese. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 28. 231-238.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.*, 47 (4). 171-182.
- Muehlenkamp, M. R. and Warthesen, J. J. (1996). β -Casomorphins: Analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 79 (1). 20-26.

- Munir, M., Nadeem, M., Mahmood Qureshi, T., Gamlath, C.J., Martin, G.J.O., Hemar, Y. and Ashokkumar, M. (2020). Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrason. Sonochem.* 67, 105140.
- Nakamura, Y., Masuda, O., Tanako, T. (1996). Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk spontaneously to hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60. 488-489
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okuba, A., Yamazaki, S. and Takano, T. (1995b). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk. *J. Dairy Sci.*, 78.777-783
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T. (1995a). Antihypertensive effect of sour milk and peptide isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, 78. 1253-1257
- Nicholas, D., Williams, P., Rowlands, I. and Jamali, H.R. (2010). “Researchers’ e-journal use and information seeking behaviour”. *J. Int. Sci.*, 36 (4). 494-516
- Nielsen, S.D., Beverly, R.L., Qu, Y. and Dallas, D.C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.*, 232. 673-682.
- Niro, S., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino, E., Coppola, R., Panfili, G. and Fratianni, A. (2017). Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. *J. Dairy Sci.*, 100. 9521-9531
- Niven, G.W., Holder, S.A. and Strøman, P. (1995). A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44. 100–105.
- Ocak, E., Javidipour, I. and Tuncturk, Y. (2015). Volatile compounds of Van Herby cheeses produced with raw and pasteurized milks from different species. *J. Food Sci. Tech. Mys.*, 52(7). 4324-4332.
- Ojeda, M. Etaio, I., Valentin, D. Dacremont, C., Zannoni, M., Tupasela, T., Lilleberg, L. and Pérez-Elortondo, F.J. (2021). Effect of consumers’ origin on perceived sensory quality, liking and liking drivers: A cross-cultural study on European cheeses. *Food Qual. Prefer.* (87), 2021, 104047.
- Oluk, A.C., Guven, M. and Hayaloglu, A.A. (2014). Influence of exopolysaccharide producing cultures on the volatile profile and sensory quality of low-fat Tulum cheese during ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 67 (2). 265- 276.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Dairy Sci. Technol.* 87(2). 149 – 165.
- Ong, L. and Shah, N.P. (2008). Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis. organic acid profiles. and ACE-inhibitory activity of Cheddar cheeses ripened at 4. 8. and 12 °C. *J. Food Sci.* 73 (3). 111-120.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Torre, P. and Izco, J.M. (2005). Use of wild *Lactobacillus* strains in an adjunct culture for a Roncal-type cheese. *J. Dairy Res.*, 72 (2). 168-178
- Osman, A. M., Wong, K. K. Y., Hill, S. J. and Fernyhough, A. (2006). Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals

- formed upon reaction with polyphenols. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 340 (2). 597-603.
- Ouellette, R. J. and David Rawn, D. (2018). *Organic Chemistry* (2. Edition). Amino Acids. Peptides and Proteins. Chapter 29. 929-971.
- Öründü, S. and Tarakçı, Z. (2021). Effects of different starter culture applications pre- and post-scalding on the biochemical and sensory properties of pasta filata type cheeses. *LWT*. 136, (1), 110288.
- Özkalp, B. and Durak, Y. (1998). Konya ve Civarı Küflü Peynirlerinde Küf Florasının Araştırılması. *Tr. J. of Biology.*, (22):341-346
- Öztürk, H.İ. (2015). Geleneksel Yöntemle Üretilen Tulum Peynirlerinin Bazı Kalite Özelliklerinin. Biyopeptid İçeriklerinin ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Konya. 170 s.
- Pappa, E.C. and Sotirakoglou, K. (2008). Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chem.*, 111:606-615.
- Parente, E., Patel, H., Caldeo, V., Piraino, P. and McSweeney P.L. (2012). RP-HPLC peptide profiling of cheese extracts: A study of sources of variation, repeatability and reproducibility. *Food Chem.*, 131, 1552-1560.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68 (1). 88-113.
- Park, Y.M. and Jin, Y.K. (1998). Proteolytic pattern of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. *Small Rumin. Res.*, 28. 263-272.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Lebensm-Wiss Technol.*, 43 (1). 86-97.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.*, 16 (11).1306-1314.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 11. 347-356.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., Vivo, R. and Fernández- Salguero, J. (2009). Amino acids evolution during ripening of goats' milk cheese manufactured with different coagulants. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44. 2062-2069
- Polychroniadou, A., Michaelidou, A. and Paschaloudis, N. (1999). Effect of time. temperature and extraction method on the trichloroacetic acidsoluble nitrogen of cheese. *Int. Dairy J.*, 9. 559–568.
- Preedy, V.R. Watson, R.R. and Patel, V.B. (Eds.). (2013). *Handbook of Cheese in Health: Production, Nutrition and Medical Sciences*, Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Preuffer, M. and Schrezenmeir, J. (2000). Bioactive Substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular diseases. *Brit. J. Nutr.*, 84 (1). 155-159.
- Prieto, B., Franco, I., Fresno, J.M., Bernardo, A. and Carballo, J. (2000). Picon Bejes-Tresviso blue cheese: An overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int. Dairy J.*, 10. 159-167.

- Prripp, A.H., Shakell-Ur-Rehman, McSweeny, P.H.L., Sorhaug, T. and Fox, P.F. (1999). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single strain starters on proteolysis in miniature cheddar-type cheeses. *Int. Dairy J.*, 9: 473-479.
- Prripp, A.H., Sørensen R., Stepaniak. L. and Sørhaug. T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT.*, 39. 677–683
- Pritchard, S.R., Phillips, M. and Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Res. Int.*, 43 (5). 1545-1548.
- Rabie, A.M. (1989). Acceleration of blue cheese ripening by cheese slurry and extracellular enzymes of *Penicillium roqueforti*. *Lait.*, 69 (4). 305-314.
- Ramasamy, D., Narasimhan, R. and Khan, M.Md.H. (1999). Effect of natural and commercial enzyme on accelerated ripening of Cheddar cheese. *Cheiron*, 28 (1/2). 21-29.
- Reis Lima, M.J., Santos, A.O., Falcão, S., Fontes, L., Teixeira-Lemos, E., Vilas-Boas, M., Veloso, A.C.A. and Peres, A.M. (2019) Serra da Estrela cheese's free amino acids profiles by UPLC-DAD-MS/MS and their application for cheese origin assessment. *Food Res. Int.*, 126. 108729.
- Requena, T., Pelaez, C. and Fox, P.F. (1993) *Z Lebensm Unters Forsch* ,196:351-355
- Reynetha, D. S., Aishaa, R., Changa, C., Aulanni'amd, Chenb, H.-H., Huang, T., et al. (2013). A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins. *J. Proteomics.*, 94. 359–369.
- 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. *J. Dairy Sci.*, 88 (7). 2348-2360.
- Rychlik, M. and Bosset, J. (2001). Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *Int. Dairy J.*, 11: 903-910.
- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppala, A. and Pahkala, E. (2001). A new type of ripened. low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.*, 11 (4). 441-447.
- Sabikhi, L. and Mathur, B. N. (2001). Qualitative and quantitative analysis of β casomorphins in Edam cheese. *Milchwissenschaft.*, 56 (4). 198-200.
- Sable, S., and Cottenceau. G. (1999). Current knowledge of soft cheeses flavor ´ and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47. 4825–36.
- Sahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M. and Hayaloglu, A. A. (2019). Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. *LWT.*, 99. 525–532.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, 83 (7). 1434-1440.
- Salam, S.A., Youssef, A.M. and Effat, G. (1989). Effect of using slurried curd on the Edam cheese characteristics. *Communication in Scientific Development Research (Egypt)* 27. 13-17.

- Salum, P., Erbay, Z. and Selli, S. (2019). The compositional properties, proteolytic-lipolytic ripening parameters, and volatile compositions of commercial enzyme-modified cheeses (EMCs) with different cheese flavours. *Int. J. Dairy Technol.*, 72. 416-426.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31. 1949-1956.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L. I. and Willet, L.B. (1998). Milk-born bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 8. 393-403.
- Seçim, Y. (2018). Türk Mutfağında Kullanılan Bazı Fonksiyonel Gıdalar ve Özellikleri. *Uluslararası Global Turizm Araştırma Dergisi*. 1-2. 1-9
- Seppo, L., Jouhiainen, T., Poussa, T. and Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77. 326-330.
- Shah, N. P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.*, 84 (1). 3-10.
- Shalabi, S. I. and Fox, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese. comparison of methods. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 11. 135-151.
- Sharma, N., Sharma, R, Rajput, Y.S., Mann, B., Singh, R. and Gandhi, K. (2021). Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *Int. Dairy J.*, 114, 104920.
- Shu, G., Shi, X., Chen, H., Ji, Z. and Meng, J. (2017). Optimization of goat milk with ACE inhibitory peptides fermented by *Lactobacillus bulgaricus* LB6 using response surface methodology. *Molecules*. 22 . Article 2001
- Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B. and Wechsler, D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. & Technol*, 90: 47-73.
- Sihufe, G.A., Zorilla, S.E. and Rubiolo A.C. (2010). The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese *Food Sci. Technol.*, 43. 247-253.
- Silva, S. V., Pihlanto, A. and Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J. Dairy Sci.*, 89 (9). 3336-3344.
- Singh, S. and Kristofferson, T. (1972). Cheese flavor development using acidified curd. *J. Dairy Sci.*, 55. 744-749.
- Singh, T. K., Drake, M. A. and Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2: 139–189.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M. L. (2001). Long term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol Pharmacol.* 52 (4). 745-754.
- Smacchi, E. and Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.*, 17 (2). 129-141.
- Smit, G., Smit, B. A. and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29 (3). 591-610.

- Soccol, C.R., Medeiros, A.B.P., Vandenberghe, L.P.S. and Woiciechowski, A.L. (2007). Flavor compounds produced by fungi, yeasts, and bacteria. Y.H. Hui (Ed.). Handbook of Food Products Manufacturing. Wiley-Blackwell. West Sussex. UK. pp. 179-191.
- Sousa, M.J., Ardö, Y. and McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 11 (4-7): 327-345.
- Stanson, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16:1-6.
- Stelios, K., Paraskevi, S., Theophilos, M. and Aikaterini, G. (2009). Study of organic acids, volatile fraction and caseins of a new Halloumi-type cheese during ripening in whey brine. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44 (2). 297-304.
- Stuknyte, M., Cattaneo, S., Masotti, F. and De Noni, I. (2015). Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 168: 27-33.
- Suarez-Solis, P.V., Iniguez, R.C. and Nunez, V.M. (2002). Changes in cheese maturation with using a cheese slurry. *Alimentaria.*, 38 (330). 81-84.
- Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H. (2000). Isolation and characterisation of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.*, 11 (3). 128-131.
- Sulejmani, E., Hayaloglu, A. A. and Rafajlovska, V. (2014). Study of the chemical composition, proteolysis, volatile compounds, and textural properties of industrial and traditional Beaten (Bieno sirenje) ewe milk cheese. *J. Dairy Sci.*, 97. 1210–1224.
- Sulejmani, E., Sahingil, D. and Hayaloglu, A.A. (2020). A comparative study of compositional, antioxidant capacity, ACE-inhibition activity, RP-HPLC peptide profile and volatile compounds of herbal artisanal cheeses. *Int. Dairy J.*, 111. 104837.
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M.S., Aleem, M. and Abbas, M. (2018). Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58 (1). 105-115.
- Şahan, N., Güven, M. and Kacar, A. (2004). Farklı asitliklerdeki yoğurtlardan torba yoğurdu üretimi ve natamisin raf ömrü üzerine etkisi. *Gıda.*, 29 (1): 9-15.
- Şahingil, D. (2012). Beyaz Peynir Üretiminde Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Proteoliz, ACE-İnhibisyon Aktivitesi ve Aroma Oluşumuna Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği ABD. Tekirdağ. 163 s.
- Şahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M. and Hayaloglu, A. A. (2019). Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. *LWT.*, 99. 525–532.
- Şahingil, D., Hayaloglu, A. A., Kirmaci, H. A., Ozer, B. and Simsek, O. (2014). Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. *J. Dairy Res.*, 81. 394–402.

- Şanlıdere Aloğlu, H., (2010). Yoğurttan biyoaktif peptit eldesi ve bu peptitlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta. 95-117.
- Tekinşen, O.C., Atasever, M. ve Keleş, A. (1996). Civil peynirinin kimyasal ve organoleptik özellikleri. Vet Bil. Derg., 12(1): 65-71.
- Thierry, A., Collins, Y. F., Mukdsi, M. C. A., Mcsweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G. and Spinnler, H. E. (2017). Lipolysis and metabolism of fatty acids in cheese. In: P. L. H. Mcsweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter. and D. W. Everett. editors. Cheese: chemistry. physics. and microbiology. 4th ed. San Diego: Academic Press. pp 423–44.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M. and Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (< 3 kDa) from Burgos-type cheese. LWT., 57 (1). 359-365.
- Timón, M.L., Andrésa, A.I., Otte, J. and Petrón, M.J. (2019). Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. Food Res.Int., 120. 643-649.
- Tirelli, A., De Noni, I. and Resmini, P. (1997). Bioactive peptides in milk products. Italian J. Food Sci., 9 (2). 91-98
- Tiwari, U., Walsh, D., Rivas, L., Jordan, K. and Duffy G. (2014). Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. Food Control, 42, 248-256.
- Tomasini, A., Bustillo, G. and Lebeault, J. M. (1995). Production of Blue cheese flavour concentrates from different substrates supplemented with lipolyzed cream. Int. Dairy J., 5. 247–257.
- Topcu, A. and Saldamlı, İ. (2006). Proteolytical. chemical. textural and sensorial changes during the ripening of Turkish white cheese made of pasteurized cows' milk. Int. J. Food Prop., 9: 665-678.
- Tunçtürk, Y. (2003). Sütte bulunan biyoaktif proteinler ve peptidler. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu. İzmir. 335-340.
- Upadhyay, V.K., Mcsweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A. and Fox, P.F. (2004). Proteolysis In Cheese During Ripening. Cheese: Chemistry. Physics And Microbiology. London: Elsevier. 1(3). 391-433.
- Upadhyay, V.K., Huppertz, T., Kelly, A.L. and McSweeney, P.L.H. (2007). Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 8 (4), 485-492.
- Urala, N. and Lähteenmäki, L. (2004). Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. Food Qual. Prefer., 15(7–8). 793–803.
- Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. Int. Dairy J., 3. 389–422.
- Urbach, G. (1997). The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. In: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. 2nd Edition; Law. B.A.; Ed.; Blackie Academic and Professional: London. 253–298.
- Üçüncü, M. (2004). A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi (Cilt: I). Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. Bornova. İzmir. 543s.

- Üren, A. (1999). Üç boyutlu renk ölçme yöntemleri. *Gıda Dergisi*. 24 (3). 193-200.
- Valero, E., Sanz, J. and Martinez-Castro, I. (2001). Direct thermal desorption in the analysis of cheese volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry: comparison with simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace. *J. Chromatogr. Sci.*, 39. 222-8.
- Vandenbergh, E., Choucharina, S., Luca, S., Ketelaere, B.D., Baerdemaeker, J.D. and Claes, J. (2014). Spatio-temporal gradients of dry matter content and fundamental material parameters of Gouda cheese. *J. Food. Eng.* 142, 31-38
- Vegarud, G.E., Langsrud, T. and Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Brit. J. Nutr.*, 84 (1).91-98.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Brit. J. Nutr.*, 92 (03). 357–366.
- Viljoen, B.C., Khoury, A.R. and Hattingh, A. (2003). Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Res. Int.*, 36. 275-283.
- Vítová, E., Loupancová, B., Zemanová, J., Štoudková, H., Březina, P. and Babák, L. (2006). Solid-phase microextraction for analysis of moulds cheese aroma. *Czech J. Food Sci.*, 24 (6). 268-274.
- Voigt, D.D., Chevalier, F., Qian, M.C. and Kelly, A.L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 11. 68-77
- Wallace, J.M. and Fox, P.F. (1998). Rapid spectrophotometric fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and Cheese Fractions: A Review. *Food Chem.*, 62 (2): 217-224.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. and Van Boekel, M.A.J.S. (1999). *Principles of Milk. Properties and Processes*. Marcel Dekker, Inc New York-Basel. Dairy Tech., p726
- Wei, X., Li, J.T. and Zhao, H.X. (2013). Coupled neutrase-catalysed plastein reaction mediated the ace-inhibitory activity *in vitro* of casein hydrolysates prepared by alcalase. *Int. J. Food Prop.*, 16. 429-443.
- WHO 2001. Safety evaluation of certain food additives and contaminants / prepared by the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (WHO food additives series; 48) (57th : 2001: Rome. Italy).
- Wilkinson, M.G. and Kilcawley, K.N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 15. 817-830.
- Wilkinson, M.G., Doolan, I.A. and Kilcawley, K.N. (2011). Enzyme-modified cheese *Encycl. Dairy Sci.*, 1. 799-804.
- Wolf, I.V., Perotti, M.C. and Zalazar, C.A. (2011). Composition and volatile profiles of commercial Argentinean blue cheeses. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 385-393.
- Xia, Y., Yuan, R., Weng, S., Wang, G., Xiong, Z., Zhang, H., Song, X., Liu, W. and Ai, L. (2020). Proteolysis, lipolysis, texture and sensory properties of cheese ripened by *Monascus fumeus*. *Food Res. Int.*, 137. 109657

- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. and Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chem.*, 119. 1557-1565.
- Yamamoto, N. and Takano, T. (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung.*, 43 (3). 159-164.
- Yao, S., Agyei, D. and Udenigwe, C.C. (2018). Structural basis of bioactivity of food peptides in promoting metabolic health. *Adv. Food. Nutr. Res.* 2018; 84: 145-81.
- Yarlagadda, A.B., Wilkinson, M. G., Kilcawley, K. N. and O'Sullivan, M.G. (2014). Utilisation of microfluidisation to enhance enzymatic and metabolic potential of lactococcal strains as adjuncts in Gouda type cheese. *Int. Dairy J.*, 38. 124-132.
- Yaşar, M. (2018). Termosonikasyon Uygulanmış Sütten Üretilen Beyaz Peynirlerin Yağ Asidi. Uçucu Aroma Bileşenleri ve Tekstürel Özelliklerinin Belirlenmesi. Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 61 s.
- Yaşar, K. (2007). Farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının ve olgunlaşma süresinin Kaşar peynirlerinin özellikleri üzerine etkisi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Yetim, H. (2001). Enstrümental Gıda Analizleri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 224. Erzurum. 219s.
- Yılmaz, F. (2019). Kaşar Peyniri Üretiminde Sonikasyon Uygulanmış Bazı Lakobasillerin Peynirin Olgunlaşması ve Kalitesi Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Erzurum. 184 s.
- Yoshioka, K. and Hashimoto, N. (1983). Cellular fatty acid and ester formation by brewers' yeast. *Agr. Biol. Chem.*, 47:2287.
- Yvon, M. and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.*, 11. 185–201.
- Zarmpoutis, I.V., Mcsweeney, P.L.H. and Fox, P.F. (1997). Proteolysis in blue-veined cheeses: An intervarietal study. *Irish J. Agric. Food Res.*, 36. 219-229.
- Zarmpoutis, I.V., Mcsweeney, P.L.H., Beechinor, J. and Fox, P.F. (1996). Proteolysis in the Irish farmhouse blue cheese. *Irish J. Agric. Food Res.*, 35. 25-36.
- Zaragoza, R., Ros-Lis, P., Vivancos, J.V. and Martinez-Manez, J.L. (2015). Proof of concept of using chromogenic arrays as a tool to identify blue cheese varieties. *Food Chem.*, 172, 823-830.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Osman Seracettin BORAN

Adres : Bostanbaşı Mahallesi Barguzu Caddesi No:110 Aksaray
Evleri A Blok 9. Kat 39. Daire Yeşilyurt/MALATYA

Lisans : İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü-2001

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü-2012

Mesleki Deneyim ve Ödüller: 20.02.2000 tarihinden beri Tarım ve Orman Bakanlığı'nda çalışmaktayım.

Yayın Listesi:

Soltani M. Boran OS. Hayaloglu AA. (2016) Effect of various blends of camel chymosin and microbial rennet (*Rhizomucor miehei*) on microstructure and rheological properties of Iranian UF White cheese. LWT- 68: 724–728

Bakirci. S., Dagdemir. E., Boran. O.S. and Hayaloglu, A.A. (2017). The effect of pumpkin fibre on quality and storage stability of reduced-fat set-type yogurt. Int. J. Food Sci.Technol. 52. 180– 187

Gurkan, H., Boran, O.S. and Hayaloglu, A.A. (2019). Influence of purple basil extract (*Ocimum basilicum L.*) on chemical composition. rheology and antioxidant activity of set-type yoghurt. Mljekarstvo 69 (1). 42-52

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Boran, O.S. and Hayaloglu, A.A. (2021). A model cheese study: Accelerate proteolysis level, enzyme and ACE-inhibitory activities by adding cheese slurry. (Yayın Kabulü beklenilmekte.)