



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTA TOROSLAR YÖRESİNDE ÜRETİLEN GELENEKSEL TULUM PEYNİRLERİNDE OLGUNLAŞMA SÜRESİNCE PEPTİD DİNAMİĞİNİN BELİRLENMESİ

Hale İnci ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ORTA TOROSLAR YÖRESİNDE ÜRETİLEN GELENEKSEL TULUM PEYNİRLERİNDE OLGUNLAŞMA SÜRESİNCE PEPTİD DİNAMİĞİNİN BELİRLENMESİ

Hale İnci ÖZTÜRK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat AKIN

2020, 297 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Nihat AKIN
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN
Prof. Dr. Mehmet AKBULUT
Dr. Öğr. Üyesi Durmuş SERT

Bu tez çalışmasında Orta Toroslar bölgesinde geleneksel yollarla üretilen deri tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca fizikokimyasal özellikleri, proteoliz modeli, suda çözünebilir peptidler ve peptid dinamiğindeki değişim incelenmiştir. Bu kapsamda, Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerinde üretilen tulum peynirleri 4-6 °C ve %85 nispi nem koşulları altında olgunlaşmaya bırakılmış ve olgunlaşma süresinin 7., 30., 60., 90. ve 180. günlerinde analizler gerçekleştirilmiştir.

Olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde kuru madde, protein ve yağ içerikleri sırasıyla %55.43, 24.52 ve 25.34 ortalama değerlerde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresince gerçekleşen proteolize bağlı olarak suda çözünebilir azot içeriğinin arttığı ve kazein azotu içeriğinin azaldığı tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre tüm tulum peynirlerinde α_s- ve β-kazeinlerin olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak önemli ölçüde hidrolize olduğu ve olgunlaşma süresinin sonunda α_s-kazeinin %25.80-55.41 arasında ve β-kazeinin %37.90-48.25 arasında bulunduğu belirlenmiştir.

Tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarının sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) sistemi ile analizi sonucunda Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde 45 α_{s1}-kazein (KN), 2 α_{s2}-KN, 73 β-KN türevli peptid, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde 65 α_{s1}-KN, 7 α_{s2}-KN, 107 β-KN türevli peptid, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde 59 α_{s1}-KN, 11 α_{s2}-KN, 129 β-KN, 4 κ-KN türevli peptid ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 88 α_{s1}-KN, 9 α_{s2}-KN, 124 β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. α_{s1}-KN türevli peptidlerin 5-23, α_{s2}-KN türevli peptidlerin 5-15, β-KN türevli peptidlerin 5-24 ve κ-KN türevli peptidlerin 5-7 amino asit uzunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile gerçekleşen proteoliz sonucu yeni meydana gelen peptidlere bağlı olarak α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN türevli peptid sayısının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Tanımlanan peptidlerin büyük bir kısmının β-KN türevli peptidlerden meydana geldiği ve bunu sırasıyla α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-KN türevli peptidlerin takip ettiği belirlenmiştir. Karakterize edilen α_{s1}-KN türevli peptidlerin genellikle α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği, β-KN türevli peptidlerin genellikle β-KN'in C terminal bölgesinden meydana geldiği, α_{s2}-KN türevli peptidlerin genellikle α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden meydana geldiği ve κ-KN türevli peptidlerin hidrofobik *para*-κ-KN bölgesinden meydana geldiği tespit edilmiştir.

BIOPEP, EROP-Moscow, PepBank, PeptideDB, Milk Bioactive Peptide Database ve Google Scholar online veri tabanları kullanılarak tanımlanan peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antifungal, antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuar, antikarsinojenik, immünomodülatör, metal şelatlayıcı, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, prolil endopeptidaz inhibitörü,

hiperkolesterolomik, opioid, cilt yenileyici, obezite önleyici, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik özelliklerden oluşmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler tespit edilmiştir. Bu fonksiyonel özellikler arasından ACE inhibitörü peptidlerin daha yüksek sayıda bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, en fazla biyoaktif peptid sayısı β-KN türevli peptidlerde gözlemlenmiştir.

180 günlük olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid modelinde α_{s1}-KN türevli peptid ve β-KN türevli peptid oranları zıt bir seyir izlemiştir. Bu süreçte, β-KN türevli peptid oranı artarken, α_{s1}-KN türevli peptid oranının azaldığı tespit edilmiştir. α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptid oranlarının ise olgunlaşma süresince neredeyse sabit kaldığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif peptidler, kazeinler, peynir olgunlaşması, peptid sekanslama, proteoliz, tulum peyniri

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DETERMINATION OF PEPTIDE DYNAMIC DURING RIPENING OF TRADITIONAL TULUM CHEESES PRODUCED IN THE CENTRAL TAURUS REGION

Hale İnci ÖZTÜRK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Nihat AKIN

2020 Year, 297 Pages

Jury
Prof. Dr. Nihat AKIN
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN
Prof. Dr. Mehmet AKBULUT
Assist. Prof. Dr. Durmuş SERT

In this study, physicochemical properties, proteolysis model, water-soluble peptides, and peptide dynamic of skin bag tulum cheeses produced by traditional ways in the Central Taurus region have been investigated during 180 days of ripening period. In this context, tulum cheeses produced in Anamur, Mut, Karaman, and Ereğli regions were left to ripen under 4-6 °C and 85% relative humidity conditions, and the analyses were carried out on the 7th, 30th, 60th, 90th, and 180th days of ripening period.

Dry matter, protein, and fat contents of tulum cheeses were determined as an average of 55.43, 24.52 and 25.34%, respectively, throughout the ripening period. It was determined that the water-soluble nitrogen content increased, and the casein nitrogen content decreased due to the proteolysis that occurred during ripening. According to the results of SDS-PAGE analysis, α_s- and β-casein hydrolyzed significantly in parallel with the progress of the ripening period in all tulum cheeses, and 37.90-48.25% of α_s-casein and 25.80-55.41% of β-casein were found at the end of the ripening period.

As a result of analyses of water-soluble extracts of tulum cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system, 45 α_{s1}-casein- (CN), 2 α_{s2}-CN-, 73 β-CN-derived peptides from Anamur region, 65 α_{s1}-CN-, 7 α_{s2}-CN-, 107 β-CN-derived peptides from Mut region, 59 α_{s1}-CN-, 11 α_{s2}-CN-, 129 β-CN-, 4 κ-CN-derived peptides from Karaman region, and 88 α_{s1}-CN-, 9 α_{s2}-CN-, 124 β-CN-derived peptides from Ereğli region were identified. It was observed that α_{s1}-, α_{s2}-, β- and κ-CN-derived peptides were 5-23, 5-15, 5-24, and 5-7 amino acids in length, respectively. The number of α_{s1}-, α_{s2}- and β-CN-derived peptides increased with the progressive ripening days due to the newly formed peptides depending on proteolysis. The majority of identified peptides consisted of β-CN-derived peptides, followed by α_{s1}-, α_{s2}-, and κ-CN-derived peptides. Generally, α_{s1}-CN-derived peptides originated from the N-terminal part of α_{s1}-CN, β-CN-derived peptides originated from the C-terminal part of β-CN, α_{s2}-CN-derived peptides originated from the intermediate and N-terminal parts of α_{s2}-CN, and κ-CN-derived peptides arose from the hydrophobic *para*-κ-CN region.

Various biological activities including ACE inhibitory, antibacterial, antifungal, antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, anticarcinogenic, immunomodulatory, metal chelating, GLP-1 secretion enhancing, DPP-4 inhibitory, cathepsin B inhibitory, prolyl endopeptidase inhibitory, hypercholesteremic, opioid, skin regenerating, anti-obesity, brain function improving and antiamnesic properties have been

detected in characterized peptides using BIOPEP, EROP-Moscow, PepBank, PeptideDB, Milk Bioactive Peptide Database, and Google Scholar online databases. Among these functional features, ACE inhibitory peptides were found to have higher counts. Besides, the highest number of bioactive peptides was observed in β-CN-derived peptides.

In the peptide model determined over the 180 days of ripening period, the ratios of α_{s1}-CN-derived peptides and β-CN-derived peptides showed an opposite course. Within this period, the ratio of β-CN-derived peptides ascended while the ratio of α_{s1}-CN-derived peptides diminished. As for α_{s2}- and κ-CN-derived peptides, their ratios remained almost constant during cheese ripening.

Keywords: Bioactive peptides, caseins, cheese ripening, peptide sequencing, proteolysis, tulum cheese

ÖNSÖZ

Bu çalışma sürecince geçirdiğim zorlu dönemleri göz önünde bulundurduğumda bazen imkansız görünen şeylerin sabır ve çaba ile mümkün olabileceğini ve sadece biraz zaman aldığını öğrendim. Bu süreçte, tavsiyeleriyle yolumu aydınlatan, sınırsız sabrını ve desteğini esirgemeyen Saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Nihat AKIN'a, çalışmamı 19101004 nolu proje ile maddi bakımdan destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, laboratuvar çalışmalarının yanı sıra bana moral olarak da büyük destek sağlayan Arş. Gör. Dr. Talha DEMİRCİ, Gıda Yüksek Mühendisi Edibe Rabia ÖZKAN, Gıda Yüksek Mühendisi Sümeyye DEMİRCİ ve Gıda Mühendisi Gizem ÇAM'a, elektroforez analizlerini gerçekleştirmemde tüm laboratuvar imkanlarını sunan Kit-Argem/Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Araştırma Merkezi'ne, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi analizinde bilgi ve tecrübelerini aktaran Mert SUDAĞIDAN ve Gülin ÖZCAN'a, LC-MS/MS analizlerini gerçekleştirmem için bana kapılarını açan Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na ve bu analizi yürütmemde bana yardımcı olan Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK ve Arş. Gör. Elif ÖZTÜRK'e, tez yazım sürecimde bana devamlı destek olan ve moral veren ofis arkadaşım Arş. Gör. Hatice Kübra KARA'ya gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman arkamda desteklerini hissettiğim, tüm eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan annem Nigar ÖZTÜRK ve abim Murat Hakan ÖZTÜRK'e bana kendimi çok şanslı hissettirdikleri için çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesinde 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanalar Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Bu süreçte, COVID-19 salgını ile mücadele eden herkese sağlık ve şifalar dilerim.

Hale İnci ÖZTÜRK
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Tulum Peyniri Tanımı ve Üretimi 5
2.2.1. Kazeinin parçalanması 9
2.2.2. Suda çözünebilir peptidlerin parçalanması 14
2.2.3. Biyoaktif peptidler ve oluşumu 16
2.3. Proteolize Etki Eden Faktörler 18
2.3.1. Koagülant 18
2.3.2. Endojen süt proteinazları 19
2.3.3. Mikroorganizmalar 21
2.3.4. Mikrobiyal enzimler 22
2.3.4.1. Laktik asit bakterilerine ait proteinazlar 22
2.3.4.2. Laktik asit bakterilerine ait peptidazlar 22
2.3.4.3. Propiyonik asit bakterilerine ait proteolitik enzimler 24
2.3.4.4. Yüzey mikrobiyotasına ait proteolitik enzimler 25
2.3.4.5. Küflere ve mayalara ait proteolitik enzimler 25
2.4. Olgunlaşma Süresince Peynirde Gerçekleşen Proteolizin Belirlenmesi 26
2.5. Proteoliz ile Meydana Gelen Peptidlerin Sekanslanmasında Kullanılan Yöntemler 28

3. MATERYAL VE YÖNTEM **30**

3.1. Materyal 30
3.1.1. Tulum peyniri örneklerinin toplanması ve olgunlaştırılması 30
3.1.2. Örneklerin analize hazırlanması 30
3.2. Yöntem 31
3.2.1. Fizikokimyasal analizler 31
3.2.1.1. pH değerlerinin belirlenmesi 31
3.2.1.2. Titrasyon asitliğinin (%LA) belirlenmesi 31
3.2.1.3. Kuru madde oranının belirlenmesi 31
3.2.1.4. Yağ oranının belirlenmesi 31
3.2.1.5. Tuz oranının belirlenmesi 31
3.2.1.6. Kül oranının belirlenmesi 32
3.2.1.7. Su aktivitesinin belirlenmesi 32
3.2.1.8. Protein oranının belirlenmesi 32

3.2.1.9. Toplam azot oranının belirlenmesi 32
3.2.1.10. Suda çözünebilir azot oranının belirlenmesi 32
3.2.1.11. Kazein azotu oranının belirlenmesi 33
3.2.1.12. Olgunlaşma derecesinin belirlenmesi 33
3.2.2. Elektroforez analizleri 33
3.2.3. Peptidlerin sekanslanması ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi 34
3.2.3.1. Suda çözünebilir ekstraktların hazırlanması 34
3.2.3.2. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ile peptidlerin analizi ve tanımlanması 35
3.2.3.3. Biyoaktivitelerin belirlenmesi 36
3.2.4. İstatistiksel değerlendirmeler 37

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 38

4.1. Tulum Peyniri Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları ve Tartışma 38
4.1.1. pH değerlerine ait sonuçlar ve tartışma 38
4.1.2. Titrasyon asitliği değerlerine ait sonuçlar ve tartışma 40
4.1.3. Kuru madde içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 43
4.1.4. Yağ içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 46
4.1.5. Tuz içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 48
4.1.6. Kül içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 51
4.1.7. Su aktivitesi (a_w) değerlerine ait sonuçlar ve tartışma 53
4.1.8. Protein içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 56
4.1.9. Toplam azot içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 58
4.1.10. Suda çözünebilir azot içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 60
4.1.11. Kazein azotu içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma 62
4.1.12. Olgunlaşma derecesi değerlerine ait sonuçlar ve tartışma 64
4.2. Elektroforez Analizi Sonuçları ve Tartışma 67
4.3. Olgunlaşma Süresi Boyunca Peptid Dinamiği Sonuçları ve Tartışma 77
4.3.1. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri 77
4.3.1.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler 81
4.3.1.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler 88
4.3.1.3. β-kazein türevli peptidler 92
4.3.2. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri 105
4.3.2.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler 108
4.3.2.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler 118
4.3.2.3. β-kazein türevli peptidler 125
4.3.3. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri 141
4.3.3.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler 145
4.3.3.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler 158
4.3.3.3. β-kazein türevli peptidler 168
4.3.3.4. κ-kazein türevli peptidler 189
4.3.4. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri 197
4.3.4.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler 201
4.3.4.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler 218
4.3.4.3. β-kazein türevli peptidler 228

4.3.5. Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde peptid dinamiğinin ve biyoaktif özelliklerin genel olarak karşılaştırılması 251

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 260

5.1. Sonuçlar 260
5.2. Öneriler 266

KAYNAKLAR 268

ÖZGEÇMİŞ 294

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α : Alfa
β : Beta
κ : Kappa
µm : Mikrometre
A : Alanin
C : Sistein
D : Aspartik asit
dk : Dakika
E : Glutamik asit
F : Fenilalanin
G : Glisin
g : Gram
H : Histidin
I : İzolösin
K : Lizin
kDa : Kilodalton
kg : Kilogram
L : Lösin
M : Metiyonin
m/z : Kütle/yük
mL : Mililitre
mm : Milimetre
N : Asparajin
P : Prolin
Q : Glutamin
R : Arjinin
S : Serin
T : Treonin
V : Valin
W : Triptofan
Y : Tirozin

Kısaltmalar

ACE : Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Ala : Alanin
Arg : Arjinin
Asn : Asparajin
Asp : Aspartik asit
a_w : Su aktivitesi
B. : *Brevibacterium*
Cys : Sistein
Gln : Glutamin
GLP-1 : Glukagon benzeri peptid
Glu : Glutamik asit
Gly : Glisin
His : Histidin
Ile : İzolösin
L. : *Lactobacillus*
La : Laktik asit
LAB : Laktik asit bakterileri
Lc. : *Lactococcus*
LC-MS/MS : Sıvı Kromatografi Tandem Kütle/Kütle Spektrometre
Leu : Lösin
Leu. : *Leuconostoc*
Lys : Lizin
KN : Kazein
Met : Metiyonin
NCBI : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
P. : *Propionibacterium*
Phe : Fenilalanin
Pro : Prolin
RP-HPLC : Ters faz- yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RT : Alıkonma süresi
SDS : Sodyum dodesil sülfat
Ser : Serin
Spp : Türler
Subsp. : Alt türler
Thr : Treonin
Trp : Triptofan
Tyr : Tirozin
Val : Valin

1. GİRİŞ

Tulum peyniri ülkemizde en yaygın olarak tüketilen ilk üç peynir çeşidinden biridir. Genel olarak, tulum peyniri çiğ sütten geleneksel yöntemlerle üretilmekte ve belirli bir süre olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulmakta olup, üretiminde genellikle koyun ve keçi sütleri tercih edilmektedir. Ancak, son yıllarda artan talep nedeniyle tulum peyniri üretiminde inek sütü de kullanılmaya başlanmıştır (Akın, 2010). Tulum peyniri, uzun süre depolanmasını sağlamak ve dayanıklılığı artırmak amacıyla Orta Asya'dan günümüze kadar peynirin keçi derilerine (tulumlarına) basılması sonucu elde edilen bir üründür ve ismini de basıldığı deriden almaktadır (Durlu-Özkaya ve Gün, 2007). Tulum peyniri üretiminde, geleneksel bir lezzet elde etmek için starter kültür kullanmadan doğal çiğ süt mikrobiyotasından (*Brucella* türleri hariç) faydalanılmaktadır. Çiğ sütte doğal olarak bulunan mikroorganizmaların gelişimi laktozdan laktik asit üretimine bağlı olarak kontrol altına alınmaktadır. Dolayısıyla, uzun süre olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulan tulum peynirinde, bu mikroorganizmalardan bazıları elimine olarak ilerleyen olgunlaşma günlerinde ortamdaki diğer mikroorganizmalar peynir ortamında baskın hale gelmektedir (Öztürk ve Akin, 2018).

Peynirin olgunlaşması sırasında, peynirde aroma ve tekstür gelişimine yardımcı olan lipoliz, proteoliz ve glikoliz gibi çeşitli biyokimyasal prosesler meydana gelmektedir. Bu prosesler genel olarak aroma oluşumu üzerinde büyük bir öneme sahip olup, bunlar arasında özellikle proteoliz çoğu peynir çeşidinin olgunlaşması sırasında meydana gelen tekstür ve aroma gelişimine katkıda bulunan karmaşık ve temel bir biyokimyasal işlem olarak kabul edilmektedir. Peynir olgunlaşması sırasında süt proteinlerinde meydana gelen temel biyokimyasal proseslerden biri olan proteolize; peynirde kalan peynir mayasındaki enzimlerin (rennet) aktivitesi, sütteki endojen proteolitik enzimler (plazmin, somatik hücre proteinazları, katepsinler), starter, starter olmayan veya ikincil mikrobiyotaya ait mikrobiyal enzimler ve peynir olgunlaşmasını hızlandırmak için sonradan dışarıdan eklenen ekzojen proteinazlar veya peptidazlar neden olmaktadır (McSweeney, 2004). Olgunlaştırma sırasında proteinazların veya peptidazların aktivitesine bağlı olarak gerçekleşen proteoliz reaksiyonu ilk olarak kazeinlerin büyük ve orta büyüklükteki peptidlere parçalanmasını sağlamaktadır. Meydana gelen bu peptidler, olgunlaşmanın ilk aşamasında, peynir tekstüründe büyük değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca, büyük peptidler ve oligopeptidler, çoğunlukla mikrobiyotanın enzimatik aktiviteleri için substratlar olarak işlev görerek peynirde pozitif

aroma oluşumuna katkıda bulunurlar (Gagnaire ve ark., 2011). Bununla birlikte, meydana gelen ileri proteoliz reaksiyonu sonucunda kısa peptidler ve serbest amino asitler meydana gelmektedir ve bu reaksiyon ürünleri peynirde aromanın oluşumu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (McSweeney, 2004).

Proteoliz üzerine etkili olan faktörler göz önünde bulundurulduğunda, üretim prosesindeki değişiklikler olgunlaşmış peynirdeki son peptid kompozisyonu üzerinde önemli ölçüde etkili olabilmektedir (Pisanu ve ark., 2015). Bu durumda, üretimde kullanılan teknoloji, olgunlaştırma koşulları ve kullanılan starter kültürlerin ve koagülantların türü de peptidlerin oluşumunu etkileyebilmektedir. Tulum peyniri geleneksel olarak, çiğ koyun, keçi, inek veya bu sütlerin karışımı kullanılarak ısıl işlem uygulamadan ve starter kültür kullanılmadan çiğ sütün buzağı renneti ile pıhtılaştırılması sonucu elde edilen telemenin keçi derisine basılmasıyla üretilmektedir ve belirli koşullar altında uzun süre olgunlaştırılmaktadır. Tulum peynirinin olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteoliz ile meydana gelebilecek peptidler, kazein türevlerindendir. Burada etkili olan enzimler, rennetle ve sütün doğal enzimleri ile birlikte olgunlaşma sırasında aktivite gösteren mikrobiyal orijinli enzimlerdir (intrasellüler ve ekstrasellüler enzimler). Çünkü geleneksel ürünümüz olan tulum peyniri üretiminde, starter kültür kullanılmadan yalnızca çiğ süt kullanılması nedeniyle çiğ sütte bulunan doğal mikrobiyota peynir özellikleri üzerinde daha aktif olmaktadır. Dolayısıyla, diğer peynir çeşitlerine kıyasla tulum peynirinde çeşitli proteolitik mikrobiyal enzimler bulunabilmektedir. Bu durumun tulum peynirinin peptid profilini önemli ölçüde etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca, ısıl işlem uygulamadan gerçekleştirilen üretimin de peptid oluşumu üzerinde avantajları vardır. Çünkü ısıl işlem, süt proteinlerinde çeşitli modifikasyonlara neden olmakla birlikte (Spanneberg ve ark., 2012), bakteriyel çeşitlilik ve endojen proteolitik enzimler üzerinde de olumsuz etkiye sahiptir (Gaya ve ark., 2005; Raynal-Ljutovac ve ark., 2007). Buna bağlı olarak, süt proteinazlarında ve bu enzimlerin substratlarında meydana gelen değişiklikler de olgunlaşmış peynirdeki son peptid kompozisyonunu etkileyebilir.

Yapısal öncül proteinler içerisinde kodlanan ve bu proteinler içerisinde inaktif formdan proteoliz ile aktive olan farklı spesifik özellikler göstererek önemli fizyolojik fonksiyona sahip peptidler biyoaktif peptidler olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif peptidler, genellikle 2-20 amino asit R gruplarına sahip kısa zincirli peptidlerdir (Mohanty ve ark., 2016). Bu peptidlerin, immünomodülatör, antitrombotik, antioksidan, mineral bağlayıcı, antihipertansif ve antimikrobiyal etkileri gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip oldukları bildirilmiştir (Hayes ve ark., 2007a). Süt proteinleri,

biyoaktif peptidlerin ana kaynağını oluşturmaktadır. Sütte bulunan çoğu biyoaktif peptid, süt proteinlerinin birincil yapısı içerisinde kodlanmıştır ve ilgili peptidlerin prekürsörlerinde gerçekleşen proteoliz ile meydana gelmektedirler (Rizzello ve ark., 2005). Sütte bulunan biyoaktif peptidlerin büyük çoğunluğu α_{s1}-kazein'den meydana gelmekte olup bunu sırasıyla β-kazein ve α_{s2}-kazein takip etmektedir ve çok az olarak κ-kazeinin de katkısı bulunmaktadır (Baum ve ark., 2013). Peynirlerin yüksek protein içeriğine sahip olmalarının yanı sıra olgunlaşma sırasında gerçekleşen proteolizin derecesi ve proteolitik enzimlerin çeşitliliği nedeniyle peynir biyoaktif peptidlerin önemli bir kaynağı olarak görülebilir (Korhonen, 2009). Olgunlaşma sırasında devam eden proteoliz reaksiyonları ile çok sayıda biyoaktif peptid meydana gelmektedir ve meydana gelen biyoaktif peptidler de ileri proteoliz reaksiyonlarıyla parçalanarak yeni kısa zincirli peptidleri meydana getirmektedir (Haque ve ark., 2008). Dolayısıyla, peynirin olgunlaşma derecesine bağlı olarak çok sayıda farklı peptid ve çeşitli biyofonksiyonel özellikler meydana gelebilir. Buna bağlı olarak, olgunlaşma sırasında biyoaktif peptidlerin ne çeşitlilik ve sayıda ve hangi fonksiyonel özelliklerde meydana geldiğini anlamak amacıyla peynir çok sayıda çalışmayı teşvik etmiştir (Saito ve ark., 2000; Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Meyer ve ark., 2009; Pritchard ve ark., 2010; Gagnaire ve ark., 2011).

Peynir olgunlaşması sırasında meydana gelen peptidlerin tanımlanması, peynirde etkili olan proteolitik prosesi ve biyoaktif özellikleri daha iyi anlama imkanı sağlamaktadır. Genellikle proteolizin geniş çaplı olarak incelenmesi amacıyla kütle spektrometresi kullanılarak Cheddar (Alli ve ark., 1998), Parmigiano Reggiano (Sforza ve ark., 2012), Emmental (Gagnaire ve ark., 2001) ve Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) gibi çeşitli peynir türlerinde olgunlaşma sırasında meydana gelen peptidler incelenmiştir. Uzun süre olgunlaştırılan ve çiğ sütten üretilen tulum peyniri, proteolitik aktiviteyi karakterize etmek için iyi bir model sunmaktadır. Ayrıca, tulum peyniri üretimi ülkemizde farklı bölgelerde geleneksel olarak gerçekleştirilmektedir ve dolayısıyla farklı bölgelerde yetişen hayvanların (koyun, keçi, inek) sütlerinin kullanılması peptid içeriğini etkileyebilir. Bu kapsamda gerçekleştirilen literatür incelemelerinde, tulum peynirinin olgunlaşması sırasında meydana gelen peptidler, proteolitik süreçteki peptid dinamiği ve coğrafi faktörlerin etkisi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak, bu araştırma Orta Toroslar yöresinde bulunan 4 farklı bölgede (Konya-Ereğli, Karaman, Mersin-Mut, Mersin-Anamur) geleneksel yöntemlerle üretilen deri tulum peynirlerinde toplam 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca gerçekleşen proteoliz ile

meydana gelen suda çözünebilir peptidlerin kromatografik teknikler kullanılarak 7, 30, 60, 90 ve 180 günlük zaman aralıklarında tanımlanması ve olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid dinamiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Suda çözünebilir ekstraktlarda bulunan peptidler sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca elde edilen peptid sekanslarına ait veriler ışığında, bu peptidlerin fonksiyonel özellikleri çeşitli veri tabanları kullanılarak tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca (7, 30, 60, 90 ve 180 günlük zaman aralıklarında) tulum peynirlerinin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir ve SDS-PAGE jel elektroforezi ile proteoliz süreci takip edilmiştir. Özetle, bu araştırmada farklı coğrafi bölgelerden alınan tulum peyniri örneklerinin fizikokimyasal özellikleri, proteoliz süreçleri ve peptid profili veya dinamiği arasındaki farklıklar ve bunların 180 günlük bir olgunlaşma süresi boyunca değişimi incelenmiş olup coğrafi farklılıkların ve olgunlaşma süresinin ürünün belirtilen özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tulum Peyniri Tanımı ve Üretimi

Türkiye'de 50'den fazla peynir çeşidi üretilmekte ve üretilen peynirlerin yaklaşık %90'ını sırasıyla beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniri oluşturmaktadır (Hayaloğlu, 2008). Tulum peyniri başlangıçta yöresel olarak ve küçük çapta üretilirken sonrasında tüketici beğenisi kazanması ile daha fazla miktarlarda üretilen, yüksek fiyatlarda piyasaya sunulan ve ihracatı gerçekleştirilen peynirler arasında yer alarak yüksek ekonomik değere sahip bir peynir çeşidimizdir (Hayaloglu ve ark., 2007). Genel olarak, Tulum peyniri enzim ilavesi ile pıhtılaştırılan sütten elde edilen telemenin mercimek büyüklüğünde ufalanıp tuzlandıktan sonra keçi derilerinden yapılmış tulumlara basılması ve belirli bir süre olgunlaştırarak tüketime sunulması sonucu elde edilen peynir olarak tanımlanmaktadır (Akın, 2010). Yarı sert peynir grupları arasında yer alan tulum peyniri kullanılan süte bağlı olarak beyaz veya krem renkte olması, yüksek kuru madde ve yağ oranı, homojen ve kolay dağılmayan bir yapısı ve kendine özgü keskin bir tada sahip olması ile karakterize edilmektedir (Hayaloglu ve ark., 2007). Geleneksel olarak üretiminde koyun ve keçi sütleri veya bunların karışımı tercih edilmekte olup son yıllarda inek sütü de üretimde kullanılmaya başlanmıştır. Tulum peyniri genel olarak çiğ sütten üretilmektedir ve ön olgunlaştırmayı takiben obruk, mağara, mahzen veya soğuk hava depolarında (0-8 °C'de) olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulmaktadır (Sert ve Akın, 2008).

Ülkemizde en fazla üretimi gerçekleştirilen peynir çeşitlerinden biri olan tulum peyniri Trakya yöresi dışında çoğu yörede üretilmektedir ve üretildikleri yörelere göre çeşitli isimlerle anılmaktadır (Durlu-Özkaya ve Gün, 2007). Bölgelere göre adlandırılan tulum peynirlerinin yaygın olarak bilinenleri Divle, Anamur, İzmir, Erzincan (Şavak) ve Çimi tulum peynirleridir. Peynir üretiminde kullanılan süt türünün ve kompozisyonunun yörelere göre farklılık göstermesi piyasada çok çeşitli karakteristik özelliklerde tulum peyniri olmasına neden olmaktadır (Çalım, 2007).

Tulum peyniri üretimi, koyun ve keçi sütünün yoğun olarak elde edildiği Mart-Temmuz aylarında gerçekleştirilmektedir. Geleneksel olarak tulum peyniri çiğ sütten üretilmektedir. Kullanılan çiğ sütün sıcaklığı, mayalanma sıcaklığı olan 32-33 °C'ye ayarlandıktan sonra buzağı, kuzu veya oğlak şirdeninden elde edilen peynir mayası eklenerek süt pıhtılaşmaya bırakılır. Oluşan pıhtı parçalandıktan sonra peynir altı suyunu

uzaklaştırmak amacıyla pıhtı bez keselere aktarılarak süzülür. Daha sonrasında süzme işlemini hızlandırmak için bez torbalar bir ağırlık altında baskıya alınır. Bazı durumlarda baskı tamamlandıktan sonra peynir kalıplar haline kesilir ve kalan peynir altı suyunu uzaklaştırmak amacıyla su ile yıkanır. Peynir altı suyu ayrılmış olan ve pH değeri yaklaşık 5.2'ye ulaşan peynirler baskıdan alınır, geleneksel olarak üretimde genellikle istenilen asitlik değerine ulaşılması amacıyla baskılama işlemine gece boyunca devam edilmektedir. Baskıdan alınan peynirler mercimek tanesi büyüklüğünde, 3-5 mm^3'lük küçük parçalara ufalanır. Ufalanan peynirlere %2-3 oranında tuz ilave edilip önceden temizlenmiş olan koyun veya keçi derisi tulumlarına sıkıca hiç hava boşluğu bırakmadan basılır. Basılan tulumların ağzı uygun bir şekilde kapatılır ve fazla suyun kolay bir şekilde uzaklaşması amacıyla tulumlar çeşitli yerlerinden bir şiş yardımıyla delinir. Hazırlanan tulumlar öncelikle 10-15 °C'de ön olgunlaştırma işlemine tabi tutulur. Ön olgunlaştırma işlemi deri yüzeylerindeki fazla suyun uzaklaşmasına bağlı olarak 3-7 gün arasında gerçekleştirilir. Ön olgunlaştırması tamamlanan tulumlar, 4-6 °C'de %85 nispi nemli soğuk hava depolarında ya da obruk veya mağaralarda yaklaşık 4-6 ay olgunlaşmaya bırakılır. Olgunlaşma süresince çiğ sütte bulunan doğal mikrobiyota ve kullanılan keçi derisi, tulum peynirine özgü keskin tat ve aromanın oluşmasını sağlamaktadır (Üçüncü, 2008).

Tulum peynirinin fizikokimyasal, duyusal ve mikrobiyolojik özellikleri işleme ve olgunlaştırma koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Deri tulumu, hava ve nem transferini kontrol etmek için küçük gözeneklere sahiptir ve böylece mikrobiyal aktiviteyi iyileştiren bir ambalaj malzemesi olarak kullanılmaktadır. Tulum peyniri üretiminde, starter kültür kullanılmaması nedeniyle doğal çiğ süt mikrobiyotası fermantasyonda rol olmaktadır. Fermantasyon peynir altı suyunun ayrılması ile başlamaktadır ve olgunlaşma süresince devam etmektedir. Laktoz fermantasyonu sonucu oluşan laktik asit mikrobiyal gelişimi kontrol altına almaktadır. Dolayısıyla, gelişen asitliğe bağlı olarak mikrobiyal dinamik de değişmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca, peynir ortamında hakim olan mikroorganizmalar glikoliz, proteoliz ve lipoliz yoluyla bazı lezzet bileşenleri üreterek peynirde karakteristik tat ve aromanın oluşmasına katkıda bulunmaktadırlar (Öztürk ve Akin, 2018).

2.2. Peynir Olgunlaşması ve Proteoliz

Peynir olgunlaşması çok çeşitli biyokimyasal, mikrobiyolojik ve metabolik süreçlerin bir sonucu olarak gerçekleşmektedir. Bu prosesler, peynirin karakteristik tadı ve yapısı üzerinde etkili olan reaksiyonlarla doğrudan ilgilidir (Farkye, 2004). Olgunlaşma sürecince, ilk sırada meydana gelen reaksiyonlar glikoliz, lipoliz ve proteoliz olup, bu reaksiyonlar peynirde aroma oluşumu ve peynirin yapısal gelişimi üzerinde etkili olmaktadır. İkinci sırada ise peynirin aromasındaki ve yapısındaki son değişikliklere neden olan yağ asitlerinin esterleşmesi ve oksidasyonu, amino asitlerin dekarboksilasyonu, deaminasyonu ve desülfürizasyonu gibi reaksiyonlar yer almaktadır (McSweeney, 2004).

Glikoliz reaksiyonu, peynirin üretimiyle başlayan laktozdan laktik asit üretimi için tüm peynir çeşitlerinde büyük önem taşımaktadır (McSweeney, 2004). Ayrıca, olgunlaşma sırasında gerçekleşen glikoliz reaksiyonlarıyla laktik asidin yanı sıra asetaldehit, diasetil, asetik asit, propiyonik asit ve etanol gibi çok sayıda bileşen oluşmaktadır ve bu bileşenler peynirin tadı üzerinde etkili olmaktadır (Forde ve Fitzgerald, 2000). Diğer taraftan olgunlaşma süresince meydana gelen lipoliz reaksiyonu ile trigliseritlerden, digliseritlerden ve monoglisertilerden serbest yağ asidi oluşumu meydana gelmektedir (Perotti ve ark., 2005). Meydana gelen lipoliz, lipaz enziminin aktivitesine bağlı olarak gerçekleşen hidrolitik parçalanma ile meydana gelmektedir. Peynirdeki lipaz aktivitesine, sütte mevcut olarak bulunan lipaz enzimi ve kullanılan starter, starter olmayan veya yardımcı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen lipaz enzimi neden olmaktadır. Olgunlaşma sırasında meydana gelen yağ asitleri peynirin nihai lezzeti üzerinde oldukça etkili olmaktadır. Bütirik asit ve kaproik asit keskin, ransid, sabunumsu ve keçimsi gibi keskin lezzetler oluşturmaktadır. Ayrıca, oluşan yağ asitleri olgunlaşmanın devam eden sürecinde laktonlar, esterler, metil ketonlar, alkanlar gibi diğer uçucu lezzet bileşenlerinin meydana gelmesinde prekürsör olarak rol almaktadırlar (Alewijn ve ark., 2005).

Proteoliz, peynir olgunlaşmasında büyük önem taşımaktadır ve kazeinin peptid ve amino asitlere parçalanmasına aracılık eden bir dizi biyokimyasal olayı içermektedir (Sousa ve ark., 2001). Bu biyokimyasal olaylar peynirde tat ve yapının gelişimi üzerinde etkili olmaktadır. Proteoliz, peynirin protein matrisinin hidrolizi olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla, peynirde peptid bağlarının hidrolize olması sonucu meydana gelen iyonize olmuş karboksilik asit ve amino grupları su bağlama kapasitesinde artışa neden

olmaktadır ve su moleküllerinin bağlanmasıyla su aktivitesindeki (a_w) meydana gelen azalma ile peynir yapısının gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, proteoliz ile meydana gelen kısa peptidler içerdikleri amino asit kompozisyonuna bağlı olarak peynir aromasının oluşumunda rol almaktadır (Ardö ve ark., 2017). Peynirde gerçekleşen proteolizin son ürünleri olan çoğu amino asidin karakteristik tadı vardır ve umumi lezzete neden olan glutamat amino asidi (Glu) olgunlaşmış peynirlerin lezzetli tadının oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Andersen ve ark., 2010). Diğer serbest amino asitler ise tatlı, acı, asidik veya muhtemelen tuzlu tatların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Roudot Algaron, 1996). Proteoliz, genellikle olgunlaşma sürecine odaklanan çalışmalarla farklı peynir çeşitlerinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Diezhandino ve ark., 2015; Ivens ve ark., 2017; Mane ve ark., 2019). Olgunlaşma sırasında peynirde meydana gelen peptidlerin birçoğu biyoaktiftir. Nem içeriği, pH, kalan koagülant aktivitesi, plazminojenin plazmine aktivasyonu, belki proteolitik veya peptidolitik bir olgunlaşma mikrobiyotasının gelişimi ve peynirin olgunluk düzeyini belirleyen üretim uygulamalarındaki (özellikle sıcaklık/zaman profilleri) ve süt kompozisyonundaki farklılıklar nedeniyle proteolizin kapsamı ve yolları önemli derecede farklılıklar göstermektedir (Ardö ve ark., 2017).

Olgunlaşma sırasında peynirde gerçekleşen proteoliz; sütte doğal olarak bulunan proteinazlar, koagülant, starter ve starter olmayan bakteriler ve eğer kullanıldıysa olgunlaşma kültürleri ve ekzojen proteolitik enzimleri içeren çeşitli kaynaklardaki proteinazlar ve peptidazlar ile katalize olmaktadır. Koagülant türü kimozin, pepsin, fungal asit proteinazlar ve bitki asit proteinazları gibi içerdiği enzimleri ifade etmektedir. Pıhtıda kalan koagülant aktivitesi Cheddar ve Gouda gibi mezofilik kültürler ve düşük ısıtma sıcaklıkları kullanılarak üretilen peynirlerdeki ilk proteolitik aktivitenin ana kaynağını teşkil etmektedir. Parmigiano-Reggiano ve Emmental gibi yüksek ısıtma sıcaklıkları kullanılarak üretilen peynir türlerinde ise, koagülant enzimler üretim sırasında çok ya da az inaktive olmaktadır. Koagülant aktivitesine ek olarak sütte bulunan proteinazlar da proteoliz üzerinde önemli etkiye sahiptir. Sütte bulunan proteinazların en önemlisi plazmindir. Plazmin ısıya dirençli olup optimum çalışma pH'sı 7.5 olan bir enzimdir. Dolayısıyla plazmin, yüksek sıcaklıklar kullanılarak ısıtılan peynirlerde yüksek oranda aktif olmaktadır ve olgunlaşma sırasında plazmin enziminin aktivitesi pH ile artmaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Genellikle çoğu peynirin üretiminde starter laktik asit bakterileri (LAB) kullanılmaktadır. LAB, hücre duvarı ilişkili proteinazları (CEP, laktosepin, PrtP)

içermektedir. Olgunlaşma süresinin başlarında koagülanttaki kimozinin veya sütteki plazminin etkisiyle kazeinden meydana gelen orta büyüklükteki peptidler, kullanılan kültürlere ait proteinazlar vasıtasıyla kısa peptidlere parçalanmaktadır. Ayrıca starter kültürler, kısa peptidleri hidroliz eden ve amino asitleri meydana getiren peptidazların da ana kaynağıdır (Ardö ve ark., 2017). Olgunlaşma sırasında, peynirler starter olarak kullanılan bakteriler dışında sonradan gelişen ikincil bir mikrobiyotaya sahip olabilmektedirler. Bu mikroorganizmalara ait peptidazlar da benzer şekilde olgunlaşma sürecine katkıda bulunmaktadırlar. Ayrıca, bazı peynir çeşitleri küflerin, mayaların ve LAB olmayan bakterilerin gelişimi ile karakterize edilmektedir. Bunlar olgunlaşma kültürleri olarak süte eklenmektedir veya gelişmeleri teşvik edilmektedir (Irlinger ve ark., 2017). Bu mikroorganizmaların birçoğu spesifik peynir çeşitlerinde proteolize katkıda bulunan proteinazları ve peptidazları içeren potansiyel enzim aktivitelerine sahiptir.

2.2.1. Kazeinin parçalanması

Sütte doğal olarak bulunanlar proteinlerin yaklaşık %80'ini kazeinler ve %20'sini serum proteinleri oluşturmaktadır. Peynir üretimi sırasında serum proteinleri peynir altı suyuna geçmektedir ve peynir altı suyunun süzülmesiyle peynirden uzaklaşmaktadır (Üçüncü, 2013). Dolayısıyla peynirin protein içeriği bakımından kazeinler büyük önem taşımaktadır. Sütte miseller halinde bulunan kazeinler α_{s1}-, α_{s2}-, β-, ve κ- ve γ-kazeininden meydana gelmektedir ve pH 4.6'da çökmektedirler (O'Regan ve ark., 2009). İnek sütünde bulunan α_{s1}-, α_{s2}-, β-, ve κ-kazein oranları sırasıyla %39-40, %10-11, %32-33 ve %11-12'den oluşmaktadır (Wijesinha-Bettoni ve Burlingame, 2013). Keçi sütü %5-6 α_{s1}-kazein, %19-20 α_{s2}-kazein, %54-55 β-kazein ve %20-21 κ-kazein içermekteyken, koyun sütünde ise %6-7 α_{s1}-kazein, %22-23 α_{s2}-kazein, %61-62 β-kazein ve %8-9 κ-kazein bulunmaktadır (Park ve ark., 2007; Balthazar ve ark., 2017). Dolayısıyla kullanılan süt türüne bağlı olarak kazein çeşidi oranları peynirlerde değişiklik göstermektedir. Buna ek olarak, kazeinlerinin amino asit kompozisyonu ve sıralaması süt türüne ve sütün özelliğine bağlı olarak değişmektedir. Koyun, inek ve keçi sütüne özgü α_{s1}-, α_{s2}-, β-, ve κ-kazeinlerinin amino asit kompozisyonu ve dizilişleri sırasıyla Şekil 2.1, 2.2, 2.3 ve 2.4'te gösterilmektedir. Ayrıca Çizelge 2.1'de kazeinlerin bileşiminde bulunan amino asitlerin tanımlamaları verilmektedir. Olgunlaştırma süresince proteolitik enzimlerin aracılık ettiği proteoliz reaksiyonu ile peynirde bulunan kazeinler parçalanmakta, kazein kaynağına bağlı olarak farklı çeşitlilik ve sayıda peptidler meydana gelmektedir.

```
  1 mklliltclv avalarpkhp ikhqglpqev lnenllrffv apfpevfgke kvnelskdig
 61 sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqllrlkkyk
121 vpqleivpns aeerlhsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgawy
181 yvplgtqytd apsfsdipnp igsensektt mplw
```

Şekil 2.1a. İnek sütünde bulunan α_{s1}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID:NP_851372)

```
  1 mkllliltclv avalarpkhp inhqglspev pnenllrfvv apfpevfrke ninelskdig
 61 sestedqame dakqmkagss ssseeivpns aekyiqkedv pserylgyle qllrlkkynv
121 pqletvpnsa eeqlhsmkeg npahqkqpmi avnqelayfy pqlfrqfyql daypsgawyy
181 lplgtqytda psfsdipnpi gsensgkttm plw
```

Şekil 2.1b. Keçi sütünde bulunan α_{s1}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001272624)

```
  1 mkllliltclv avalarpkhp ikhqglspev lnenllrfvv apfpevfrke ninelskdig
 61 sesiedqame dakqmkagss ssseeivpns aeqkyiqked vpserylgyl eqllrlkkyn
121 vpqleivpks aeeqlhsmke gnpahqkqpm iavnqlfrqf yqldaypsga wyylplgtqy
181 tdapsfsdip npigsensgk itmplw
```

Şekil 2.1c. Koyun sütünde bulunan α_{s1}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001009795)

```
  1 mkffiftcll avalakntme hvssseesii sqetykqekn mainpskenl cstfckevvr
 61 naneeeysig ssseesaeva teevkitvdd khyqkalnei nqfyqkfpqy lqylyqgpiv
121 lnpwdqvkrn avpitptlnr eqlstseens kktvdmeste vftkktklte eeknrlnflk
181 kisqryqkfa lpqylktvyq hqkamkpwiq pktkvipyvr yl
```

Şekil 2.2a. İnek sütünde bulunan α_{s2}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_776953)

```
  1 mkffiftcll avalakhkme hvssseepin ifqeiykqek nmaihprkek lcttsceevv
 61 rnaneeeysi rssseesaev apeeikitvd dkhyqkalne inqfyqkfpq ylqypyqgpi
121 vlnpwdqvkr nagpftptvn reqlstseen skktidmest evftkktklt eeeknrlnfl
181 kkisqyyqkf awpqylktvd qhqkamkpwt qpktnaipyv ryl
```

Şekil 2.2b. Keçi sütünde bulunan α_{s2}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001272514)

```
  1 mkffiftcll avalakhkme hvssseepin isqeiykqek nmaihprkek lcttsceevv
 61 rnadeeeysi rssseesaev apeevkitvd dkhyqkalne inqfyqkfpq ylqylyqgpi
121 vlnpwdqvkr nagpftptvn reqlstseen skktidmest evftkktklt eeeknrlnfl
181 kkisqyyqkf awpqylktvd qhqkamkpwt qpktnaipyv ryl
```

Şekil 2.2c. Koyun sütünde bulunan α_{s2}-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001009363)

```
  1 mplntiykqp qnqiiihsap psllvlyfgk kelramkvli laclvalala releelnvpg
 61 eiveslssse esitrinkki ekfqseeqqq tedelqdkih pfaqtqslvy pfpgpihnsl
121 pqnippltqt pvvvppflqp evmgvskvke amapkhkemp fpkypvepft erqsltltdv
181 enlhlplpll qswmhqphqp lpptvmfppq svlslsqskv lpvpqkavpy pqrdmpiqaf
241 llyqepvlgp vrgpfpiiv
```

Şekil 2.3a. İnek sütünde bulunan β-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: XP_010804480)

```
  1 mplntiykqp lnqiiihsas psllllyfgk kesramkvli laclvalaia reqeelnvvg
 61 etveslssse esithinkki ekfqseeqqq tedelqdkih pfaqaqslvy pftgpipnsl
121 pqnilpltqt pvvvppflqp eimgvpkvke tmvpkhkemp fpkypvepft esqsltltdv
181 eklhlplplv qswmhqppqp lsptvmfppq svlslsqpkv lpvpqkvvpq rdmpiqafll
241 yqepvlgpvr gpfpilv
```

Şekil 2.3b. Keçi sütünde bulunan β-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: XP_005681778)

```
  1 mkvlilaclv alalareqee lnvvgetves lssseesith inkkiekfqs eeqqqtedel
 61 qdkihpfaqa qslvypftgp ipnslpqnil pltqtpvvvp pflqpeimgv pkvketmvpk
121 hkempfpkyp vepftesqsl tltdveklhl plplvqswmh qppqplpptv mfppqsvlsl
181 sqpkvlpvpq kavpqrdmpi qafllyqepv lgpvrgpfpi lv
```

Şekil 2.3c. Koyun sütünde bulunan β-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: CAA34502)

```
  1 mmksfflvvt ilaltlpflg aqeqnqeqpi rcekderffs dkiakyipiq yvlsrypsyg
 61 lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
121 hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
181 ntvqvtstav
```

Şekil 2.4a. İnek sütünde bulunan κ-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_776719)

```
  1 mmksfflvvt ilaltlpflg aqeqnqeqpi ccekderffd dkiakyipiq yvlsrypsyg
 61 lnyyqqrpva linnqflpyp yyakpvavrs paqtlqwqvl pntvpakscq dqpttlarhp
121 hphlsfmaip pkkdqdktev paintiasae ptvhstptte aivntvdnpe assesiasas
181 etntaqvtst ev
```

Şekil 2.4b. Keçi sütünde bulunan κ-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001272516)

```
  1 mmksfflvvt ilaltlpflg aqeqnqeqri ccekderffd dkiakyipiq yvlsrypsyg
 61 lnyyqqrpva linnqflpyp yyakpvavrs paqtlqwqvl pnavpakscq dqptamarhp
121 hphlsfmaip pkkdqdktei paintiasae ptvhstptte avvnavdnpe assesiasap
181 etntaqvtst ev
```

Şekil 2.4c. Koyun sütünde bulunan κ-kazeinin amino asit kompozisyonu ve dizilişi (NCBI, Accession ID: NP_001009378)

Çizelge 2.1. Kazeinlerin bileşiminde bulunan amino asitlerin tanımlamaları

Amino asit	Kısaltma	Simge	Yapı*
Alanin	Ala	A	Nötral, hidrofobik
Arjinin	Arg	R	Bazik, hidrofilik
Asparajin	Asn	N	Nötral, hidrofilik
Aspartik asit	Asp	D	Asidik, hidrofilik
Fenilalanin	Phe	F	Nötral, hidrofobik
Glisin	Gly	G	Nötral, hidrofobik
Glutamin	Gln	Q	Nötral, hidrofilik
Glutamik asit	Glu	E	Asidik, hidrofilik
Histidin	His	H	Bazik, hidrofilik
İzolösin	Ile	I	Nötral, hidrofobik
Lizin	Lys	K	Bazik, hidrofilik
Lösin	Leu	L	Nötral, hidrofobik
Metiyonin	Met	M	Nötral, hidrofobik
Prolin	Pro	P	Nötral, hidrofobik
Serin	Ser	S	Nötral, hidrofilik
Sistein	Cys	C	Nötral, hidrofilik
Treonin	Thr	T	Nötral, hidrofilik
Triptofan	Trp	W	Nötral, hidrofilik
Tirozin	Tyr	Y	Nötral, hidrofilik
Valin	Val	V	Nötral, hidrofobik

*Hidrofobik:nonpolar, hidrofilik:polar.

Proteoliz modeli, esas olarak her peynir çeşidinde farklılık göstermektedir, ancak, bazı temel mekanizmalar tüm çeşitlerde ortak olarak görülmektedir. Ortak olarak, kazein üzerinde gerçekleşen proteolitik aktiviteler, çoğunlukla peynirde kalan koagülant aktivesi ve süt enzimi olan plazmin ile gerçekleşmektedir. Ancak, bazı peynir çeşitlerinde özellikle termofilik *Lactobacillus* ve *Penicillium*'a ait proteazlar ile de proteoliz meydana gelmektedir (Gobbetti ve ark., 1997). Ayrıca, olgunlaşma sırasında meydana gelen peptidler; starter bakterilere, starter olmayan LAB'ye ve eğer mevcutsa peynir

olgunlaşmasında rol alan diğer mikroorganizmalara ait proteinazlar ve peptidazlar tarafından kısa peptidlere ve amino asitlere hidroliz edilmektedir. Kazeinlerin ve bunlardan meydana gelen ilk büyük peptidlerin hidrolize olma derecesi peynirdeki suda veya pH 4.6'da çözünebilir azot bileşiklerinin miktarı ile orantılı olmaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Peynir üretiminden sonra kalan koagülant aktivitesi ilk olarak α_{s1}-kazeininde bulunan 23. ve 24. amino asitler arasındaki bağda etkili olarak kısa α_{s1}-kazein (f1-23) peptidinin ve uzun α_{s1}-kazein (f24-199) peptidinin meydana gelmesine neden olmaktadır (Carles ve Dumas, 1985; Fox ve McSweeney, 1997). Uzun α_{s1}-kazein (f24-199) peptidi, rennet ve orta pişirme sıcaklıklarıyla üretilen tüm peynirlerin belirli zamanlarında bulunmaktadır, ancak, Mozzarella ve Emmental gibi yüksek pişirme sıcaklıkları kullanılarak üretilen kimozin aktivitesi sınırlı olan olgunlaştırılmış peynirlerde çok az miktarda bulunmaktadır (Ardö ve ark., 2017). Olgunlaşma sırasında α_{s1}-kazein (f24-199) fraksiyonunun kimozin ile ileri derecede hidrolize olması sonucu çeşitli peptidler meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak, Mooney ve ark. (1998), α_{s1}-kazein (f24-199), (f102-199), (f110-199) ve (f99-199) C terminal peptidlerini belirlemişlerdir. Olgunlaşmanın ilerleyen zamanlarında, kimozinin yanı sıra plazmin enzimi ve mikrobiyal proteinazlar veya peptidazlar α_{s1}-kazeinin ileri parçalanmasına neden olmaktadır. Uzun α_{s1}-kazein (f24-199) peptidi, ayrıca plazmin ile de hidrolize olabilmektedir (Ardö ve ark., 2017).

Peynir olgunlaşması boyunca α_{s2}-kazein konsantrasyonu azaldığı bildirilmiştir, ancak, α_{s2}-kazein kaynaklı çok az kısa peptid tanımlanmıştır (Sousa ve ark., 2001). α_{s2}-kazein kimozin enzimine karşı α_{s1}-kazeinden daha dayanıklıdır, kimozin enziminin α_{s2}-kazein üzerindeki aktivitesi hidrofobik bölgeler ile sınırlıdır (McSweeney ve ark., 1994). Bu kazeinin iki hidrofobik alanı 90-120 ve 160-207 amino asitleri arasında bulunan bölgelerdir (Swaisgood, 1992). Sütte doğal olarak bulunan plazmin ise spesifik olarak α_{s2}-kazein'deki lizin amino asidi ile bağlı peptid bağlarının yıkımından sorumludur (McSweeney, 2004). α_{s2}-kazein plazmin enziminin etkisine karşı çok hassastır ve peynirde olgunlaşma sırasında bu proteinin tamamen kaybolması muhtemelen plazmin enziminin etkisine bağlı olmaktadır (Fox ve McSweeney, 1996).

β-kazeinin kimozin ile parçalanması çok sınırlı olmaktadır, ancak, plazmin enzimi için çok iyi bir substrattır. Plazmin enzimin aktivitesine bağlı olarak olgunlaşma süresince yüksek oranda parçalanmaktadır. Plazmin enzimi ile β-kazein γ_1-, γ_2-, γ_3-kazeinlere ve proteoz peptonlar olarak adlandırılan ilgili amino ucuna sahip peptidlere hidrolize

edilmektedir (Ardö ve ark., 2017). Çeşitli peynir türlerinde, β-kazein miktarı γ-kazeinlerin miktarının artmasıyla eş zamanlı olarak olgunlaşma sırasında azalmaktadır. Ayrıca, olgunlaşma süreci sırasında β-kazeinlerin parçalanması sonucu meydana gelen oligopeptidler amino- ve karboksipeptidazlar gibi mikrobiyal proteolitik enzimlerle ileri derecede hidrolize olarak kısa peptidlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Taivosalo ve ark., 2018).

Kappa kazeinin rennet ile parçalanması sonucu peynirde kalan *para*-κ-kazein gerçekleşen proteolize daha az duyarlıdır. *Para*-κ-kazeinin kimozin ile ileri derecede parçalanmadığı ancak plazmin veya mikrobiyal enzimler vasıtasıyla olgunlaşma sırasında peynirde düşük miktarda hidrolize olduğu bildirilmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1993). Diğer taraftan, Vicente ve ark. (2001) *para*-κ-kazeini miktarının 180 günlük olgunlaşma süresince aynı kaldığını bildirmişlerdir. Genellikle gerçekleştirilen çoğu çalışmada, olgunlaşma sırasında κ-kazein kökenli peptidlere hiç rastlanılmamakta veya az miktarda belirlenmektedir (Gagnaire ve ark., 2011; Fontenele ve ark., 2017).

Çoğu peynirde, α_{s1}-kazein β-kazeinden daha hızlı hidrolize olurken, Emmental ve Parmigiano-Reggiano peynirlerinde β-kazein α_{s1}-kazein'den daha hızlı hidrolize olmaktadır (Sousa ve ark., 2001). Bu durum, Emmental ve Parmigiano-Reggiano peynirlerinin üretimi sırasında uygulanan yüksek ısıl işlem ile kimozinin denatüre olduğunu ve plazminin rol aldığını göstermektedir. Genellikle, olgunlaşma sırasında kazeinlerin parçalanması sonucu meydana gelen peptidler en çok β-kazein kökenli olmakla birlikte bunu sırasıyla α_{s1}-kazein, α_{s2}-kazein ve κ-kazein takip etmektedir (Sadat-Mekmene ve ark., 2013).

2.2.2. Suda çözünebilir peptidlerin parçalanması

Koagülant veya plazmin aktivitesi ile kazeinlerden meydana gelen peptidler olgunlaşma süresinin ilerleyen zamanlarında starter veya starter olmayan bakteriler tarafından çok sayıda peptide hidrolize edilmektedir. Peptid kompozisyonu olgunlaşma sırasında dinamik olarak değişmektedir, çünkü meydana gelen bazı peptidler hızlı bir şekilde ileri parçalanma geçirmekteyken diğer peptidler ise birikmektedir. Her peynir çeşidinde, peynir matriksinin fiziksel koşullarının yanı sıra mevcut enzim aktiviteleri peptid kompozisyonunun spesifik olarak gelişimini etkilemektedir (Ardö ve ark., 2017).

Cheddar peynirin sulu ektsraktlarında meydana gelen α_{s1}- ve β-kazein türevli peptidlerin büyük bir çoğunluğunun N terminal yarısından meydana geldiği gösterilirken, α_{s2}-kaynaklı peptidlerin ise genellikle C terminal yarısından meydana geldiği gösterilmiştir (Singh ve ark., 1997; Fernández ve ark., 1998; Ardö ve ark., 2017). Olgunlaşmış peynirlerde genel olarak bu peptidler hakimdir. Cheddar peynirinin suda çözünebilir fraksiyonlarında α_{s1}-kazein kaynaklı kısa peptidler yüksek oranda bulunmaktadır. Cheddar peynirinde α_{s1}-kazein (f1-9) ve α_{s1}-kazein (f1-13) peptidlerinin biriktiği bildirilmiştir (Singh ve ark., 1994). Bazik amino asitler ve prolin içeren amino ucuna sahip bu peptidlerin parçalanmadan olgunlaşma süresince birikmesi Cheddar peyniri üretiminde kullanılan starter bakterilerde bu amino asitlerin parçalanması için gerekli peptidazların bulunmadığını göstermektedir.

Gouda ve Herrgård gibi yarı sert peynirler olgunlaşma sırasında daha yüksek bir pH'ya sahip olmalarından dolayı plazmin bu peynirlerde daha aktif olmaktadır. Dolayısıyla, bu çeşit peynirlerde daha yüksek miktarda plazmin kaynaklı peptidler bulunmaktadır (Ardö ve ark., 2007). Tıpkı Cheddar peynirinde olduğu gibi, bu çeşit peynirlerde de α_{s1}-kazeinin amino terminalindeki kısa peptidler peynirde birikirken, diğer peptidler starter bakteriler tarafından hızlı bir şekilde parçalanmaktadır.

Parmigiano-Reggiano peynirinin sulu fazındaki peptidlerin dinamik kompozisyonu Sforza ve ark. (2012) tarafından incelenmiştir. Peynir yapımı sırasında, sınırlı sayıda kısa peptidler oluşmaya başlamıştır ve bazılarının kimozin aktivitesi ile oluştuğu belirlenmiştir. Bu kısa peptidlerin, iki gün içerisinde peynirde tamamen parçalanıp yok olduğu tespit edilmiştir. Genellikle tanımlanan peptidlerin büyük bir kısmı olgunlaşma sırasında maksimuma ulaştıktan sonra azalmıştır. Bir buçuk yıl olgunlaşma süresinin sonunda Parmigiano-Reggiano peynirinde β-kazein 11-28 amino asit pozisyonları arasındaki oldukça kısa boyutlarda olan fosfopeptidler baskın hale gelmiştir ve yaklaşık 24 ay sonra bu peptidlerin tamamen parçalandığı bildirilmiştir.

Gagnaire ve ark. (2001) Emmental peynirinin sıvı fazında, 91 peptid tanımlamışlardır, bunlardan 52'sinin α_{s1}-kazein kökenli, 29'unun β-kazein kökenli, 9'unun α_{s2}-kazein kökenli ve 1'inin κ-kazein kökenli olduğunu bildirmişlerdir. Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde antihipertansif özelikler gösteren β-kazein (58–72), β-kazein (193–202), α_{s1}-kazein (85–91), α_{s1}-kazein (1–9) ve α_{s2}-kazein (189–197)'den oluşan çeşitli suda çözünebilir peptidler tanımlanmıştır. Pisanu ve ark. (2015), çiğ ve pastörize koyun sütü kullanılarak üretilen ve 9 ay olgunlaştırılan peynirlerden α_{s1}-kazein, α_{s2}-kazein ve β-kazein kökenli toplam 187 adet suda çözünebilir peptid

belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, uygulanan ısıl işleme bağlı olarak peptid sayısının azaldığını tespit etmişlerdir. Muhtemelen pastörizasyon işlemi ile sütte bulunan endojen proteolitik enzimlerin inaktive olması pastörize edilmiş peynirlerde peptid miktarını azaltmaktadır. Ayrıca, pastörizasyon işleminin protein yapısında bazı modifikasyonlara neden olduğu tespit edilmiş, buna bağlı olarak farklı peptid çeşitlerinin de meydana geldiği belirlenmiştir.

2.2.3. Biyoaktif peptidler ve oluşumu

Gelişmiş çeşitli proteolitik sistemleri içeren peynir, biyoaktif peptidler için en iyi kaynağı oluşturmaktadır. Bu peptidler, prekürsör proteinlerinde inaktif olup olgunlaşma sırasında peynirde gerçekleşen enzimatik proteoliz ile meydana gelebilmektedir (Möller ve ark., 2008). Yapısal proteinler içinde inaktif formda bulunan, ancak enzimatik aktivite sonucu açığa çıkan bu peptidler bazı spesifik özellikleriyle önemli fizyolojik fonksiyonlar göstermektedir ve dolayısıyla fonksiyonel peptidler veya biyoaktif peptidler olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif peptidler, kısa zincirli amino asit dizilerinden oluşmaktadır ve 64 amino asit içeren kazeinomakropeptid hariç olmak üzere genellikle 2-20 amino asit R gruplarını içermektedir (Hartmann ve Meisel, 2007). Biyoaktif peptidler, gerçekleştirdiği fonksiyona göre çeşitlilik göstermektedir. Amino asit dizilişi, peptidlerin terminal pozisyonları ve amino asit kompozisyonu bu çeşitliliği etkileyen en önemli faktörler olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Bu peptidler, kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık ve sinir sistemlerini etkileyebilmektedirler. Bu etkileri, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif ve immünomodülatör özellikler gösteren çok sayıda peptid sekansına atfedilmektedir (Korhonen, 2009).

Olgunlaştırılmış peynirlerin matrisinde meydana gelen peptidlerin biyoaktif özellikleri üzerinde çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Saito ve ark. (2000) Gouda peynirinde antihipertansif peptidler, Rizzello ve ark. (2005) çeşitli İtalyan peynirlerinde antibakteriyal peptidler, Silva ve ark. (2006) keçi sütünden üretilen peynirlerde antioksidan peptidler, De Simone ve ark. (2009) Mozzarella peynirinden elde edilen peynir altı suyunda sitomodülatör (hücre düzenleyici) peptidler ve Sienkiewicz-Szłapka ve ark. (2009) ise Brie, Rokfor, Edam ve Gouda peynirlerinde opioid aktiviteye sahip peptidler belirlemişlerdir. Sütte meydana gelen biyoaktif peptidlerin çoğu, α_{s1}-kazein kökenli olmakla birlikte bunu sırasıyla β-kazein ve α_{s2}-kazein kökenli peptidler izlemekte, κ-kazeinin sütteki peptidlere çok az katkısı bulunmaktadır (Baum ve ark.,

2013). Dolayısıyla, peynir biyoaktif peptidler açısından çok iyi bir model sunmaktadır.

Genellikle peynirlerde, α_{s1}-kazeinin proteolizi ile israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana geldiği bildirilmektedir (Birkemo ve ark., 2009; Pisanu ve ark., 2015; Georgalaki ve ark., 2017). İsrasidin, α_{s1}-kazeinin N terminal bölgesinde bulunan ve 23 amino asit dizilimine (RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF) sahip antimikrobiyal özellikli bir peptiddir. Bu peptidlerin çiğ sütten üretilen peynirlerde daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Pisanu ve ark., 2015). Bu antibakteriyal peptid, peynirde gerçekleşen primer proteoliz süresince kimozin ile α_{s1}-kazeinin parçalanmasından oluşmaktadır (Rizzello ve ark., 2005). Ayrıca, olgunlaşma süresince israsidinin ileri derecede proteolizi söz konusudur. Gouda peynirinde, israsidinin parçalanması ile meydana gelen RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerinin anjiyotensin dönüştürücü enzimini (ACE) inhibe ettikleri, dolayısıyla antihipertansif özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Saito ve ark., 2000). Gene israsidinin parçalanma ürünleri olan LNENLLRF ve NENLLRF peptidlerinin GLP-1 sekresyonunu artırarak kilo verdirici etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir (O'Halloran ve ark., 2018). İsrasidin kökenli VLNENLL ve NENLL peptidlerinin ise antioksidan özellikler gösterdiği ortaya konulmuştur (Hernández-Ledesma ve ark., 2005; Bezerra ve ark., 2013).

Birkemo ve ark. (2009), β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan kazesidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV) ve kazesidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI) peptidlerinin *Escherichia coli* DPC6053 suşuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu kazesidinlerin ileri parçalanma ürünü olan GPVRGPFPI peptidinin de *Lactobacillus sakei* A15 suşunun gelişimini engelleyerek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Losito ve ark., 2006). Ayrıca, kazesidin kökenli YQEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFP ve VLGPVRGPFP peptidlerin ACE inhibitörü aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Hayes ve ark., 2007b; Quirós ve ark., 2007; Torres-Llanez ve ark., 2011; Villegas ve ark., 2014). β-kazeinin C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana gelen EPVLGPVRGPFPI ve QEPVLGPVRGPF peptidlerin immünomodülatör özellik gösterdiği belirlenmiştir (Kruzel, 2011; Pisanu ve ark., 2015). Nongonierma ve ark. (2017a), kazesidin kökenli LGPVRGPFPI peptidinin dipeptidil peptidaz- 4 (DPP-4) inhibitörü aktivitesi göstererek tip II diyabeti tedavisine yardımcı olduğunu gözlemlemişlerdir. Belirli bir fonksiyonel özelliğe sahip olan peptidin parçalanması ile meydana gelen peptidler çeşitli biyoaktif özellikler sunabilmektedir. Bu çeşitlilik peptidlerde bulunan amino asit kompozisyonundaki farklılıkları yansıtmaktadır. Dolayısıyla, olgunlaşma sırasında

peynirde gerçekleşen ileri proteoliz reaksiyonları artan peptid sayısıyla ilişkili olarak biyoaktiviteyi de artırmaktadır.

2.3. Proteolize Etki Eden Faktörler

2.3.1. Koagülant

Peynir üretiminde geleneksel olarak kullanılan proteaz olan kimozin, genç memeliler tarafından salgılanan mide kaynaklı bir aspartil proteinazdır. Peynir yapımında kimozinin ilk rolü miseli stabilize eden κ-kazein proteinin Phe105-Met106 bağını hidrolize etmesidir. Peynir sütüne eklenen rennetin çoğu peynir altı suyu ile ayrılmaktadır, ancak bazısı pıhtıda kalmaktadır ve çoğu peynir çeşidinde kazeinin ilk proteolizinde önemli bir rol oynamaktadır. Enzim türüne, ısıtma sıcaklığına, peynir altı suyunu süzme pH'sına ve pıhtının nem içeriğine bağlı olarak peynir sütüne eklenen koagülantın %0 ila yaklaşık %30'u pıhtıda kalmaktadır (Ardö ve ark., 2017). Cheddar peynirinde, süte eklenen buzağı kimozininin yaklaşık %6'sı pıhtıda kalmaktadır ve peynir altı suyunu süzme pH'sının düşmesiyle birlikte kalan kimozin miktarı artmaktadır (Creamer ve ark., 1985). Son yıllarda alternatif kaynaklı kimozinler de peynir üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Børsting ve ark. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada, 6.00-6.65 aralığındaki pH değerlerinden bağımsız olarak deve kimozininin yaklaşık %20'sinin pıhtıda kaldığı, sığır kimozininin ise pıhtıda tutulma oranının pH'nın 6.65'ten 6.00'a düşmesine paralel olarak %2'den %20'ye arttığı bildirilmiştir. Parmigiano-Reggiano ve Emmental gibi yüksek sıcaklık uygulanarak ısıtılan peynirlerde kimozin üretim sırasında büyük oranda denatüre olmaktadır (Spanneberg ve ark., 2012).

Peynirde kalan kimozinin ilk etki bölgesi α_{s1}-kazeinde bulunan 23. ve 24. amino asit arasındaki bağdır (Carles ve Dumas, 1985; Fox ve McSweeney, 1997). İlerleyen olgunlaşma günlerinde α_{s1}-kazeinde ileri parçalanmalar da meydana gelmektedir. Farklı bağlardaki parçalanma oranı iyonik güce ve pH'ya bağlı olmaktadır (Ardö ve ark., 2017). α_{s2}-kazein, kimozin ile proteolize karşı nispeten dayanıklıdır ve parçalanma alanları molekülün hidrofobik bölgeleriyle sınırlı olmaktadır (90-120 ve 160-207 sekansları) (McSweeney ve ark., 1994). Møller ve ark. (2012), azalan pH değerlerine paralel olarak kimozinin β-kazeinde bulunan bağları hızlı bir şekilde parçaladığını bildirmişlerdir. Ayrıca, NaCl'nin pH'ya bağlı olarak β-kazeinin kimozin ile hidrolizini inhibe ettiğini, pH 5.2'de %2 ve %5 oranında ilave edilen NaCl'nin β-kazein kökenli peptidlerin meydana

gelme oranını sırasıyla %30'a ve %6'ya azalttığı belirlenmiştir. Artan NaCl oranlarına bağlı olarak parçalanma oranının da düştüğü görülmektedir. *Para*-κ-kazeinin kimozin ile çeşitli parçalanma bölgelerine sahip olmasına rağmen, hidrolizi tampon çözeltide ve peynirde sınırlı olmaktadır (Green ve Foster, 1974). Bu durum, diğer kazeinlere kıyasla yalnızca α_{s2}- ve κ-kazeinde bulunan disülfit bağlarının yüksek düzeyde kararlılık sağlanmasına bağlanabilir (Bhat ve ark., 2016).

Yüksek kaliteli buzağı renneti yaklaşık %10 sığır pepsini içermektedir, ancak çoğu ticari peynir mayası %50 ve 80 arasında değişen oranda sığır pepsini içermektedir (Ardö ve ark., 2017). Mulvihill ve Fox (1979) sığır, koyun, keçi ve domuz sütlerinde bulunan β-kazeinlerin aynı türlerden elde edilen kimozinler ve pepsinler ile hidrolize olmasını karşılaştırmışlardır. Meydana gelen uzun peptidler kimozinler ve pepsinler için benzer olmasına rağmen, oluşan kısa peptidlerin ise kompozisyonunda farklılıklar gözlemlenmiştir. Sığır pepsininin kimozinde olduğu gibi kazeini genel olarak aynı bölgelerden hidrolize ettiği gösterilmiştir, ancak, daha az spesifik olduğu ve bunun bir sonucu olarak çok sayıda farklı peptidin meydana geldiği bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017). Genel olarak, pepsinler kimozine kıyasla peynirde daha fazla proteolitik özellik göstermektedirler.

2.3.2. Endojen süt proteinazları

Süt çok sayıda endojen proteinazlar içermektedir ve bunlardan plazmin peynir olgunlaşmasında en önemli olanıdır. Plazmin, optimum pH ve sıcaklık derecesi sırasıyla yaklaşık 7.5 ve 37 °C olan bir serin proteinazdır. Sütte plazmin, plazminojen olarak bulunmaktadır ve daha sonra plazmine aktive olmaktadır. Sütte plazmin, plazminojen, plazminojen aktivatörleri (PA), plazmin inhibitörleri ve PA inhibitörlerinden oluşan kompleks bir plazminojen/plazmin sistemi bulunmaktadır. Plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörleri peynirde kazein miselleri ile birlikte bulunmakta ve dolayısıyla peynir altı suyuna geçmeden peynirde kalmaktadır (Ardö ve ark., 2017). Plazmin, Lys-X ve daha az olarak da Arg-X tipi bağları parçalaması nedeniyle tripsin benzeri spesifisiteye sahiptir, özellikle α_{s2}- ve β-kazein üzerinde etki göstermektedir ve κ-kazein plazminle hidrolize karşı dirençlidir (Bastian ve ark., 1997). α_{s1}-kazein, β- ve α_{s2}-kazeine kıyasla plazmin ile hidrolize karşı daha dirençlidir (Fox ve ark., 1994).

Plazminin olgunlaşma sırasında gerçekleşen proteolize katkısı peynir çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Farkye ve Fox (1990) plazmin aktivitesini Emmental peynirinde yüksek, Gouda peynirinde orta ve Cheddar peynirinde oldukça düşük olarak belirlemişlerdir. Larsson ve ark. (2006) peynirde plazmin aktivitesinin pH ile azaldığını ve 5.0-5.2 pH değerlerinde ise neredeyse hiç plazmin aktivitesinin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Bu durum Cheddar peynirindeki düşük plazmin aktivitesini açıklamaktadır. Plazmin, Emmental ve Parmigiano-Reggiano gibi yüksek sıcaklıkta ısıtılan peynirlerde önemli bir proteolitik ajandır. Çünkü bu sıcaklık derecelerinde çoğu koagülant (kimozin) inaktive olurken, ısıya karşı stabil bir enzim olan plazmin ısıtma işlemi ile aktivitesini kaybetmemektedir (Ardö ve ark., 2017). Ayrıca, yüksek ısıtma sıcaklıklarında, plazminojen aktivitörü inhibitörünün ve plazmin inhibitörlerinin ısıya bağlı inaktivasyonundan dolayı plazminojen aktive olmaktadır (Farkye ve Fox, 1990).

Çoğu peynir türünde olgunlaşma sırasında gerçekleşen proteolizde plazminin önemli bir rol oynamasından dolayı, farklı yaklaşımlar kullanılarak peynirde plazmin aktivitesini artırmaya yönelik girişimlerde bulunulmuştur. Cheddar (Farkye ve Fox, 1992), Mozzarella (Somers ve ark., 2002) ve yüzey olgunlaştırılmış peynirlerin (O'Farrell ve ark., 2002) üretiminde, ilk proteoliz ve β-kazeinin parçalanması plazmin ile zenginleştirilmiş sütün kullanılmasıyla artırılmıştır. Ayrıca, peynirlerinin üretiminde ekzojen plazminojen aktivatörlerinin kullanılması ile peynirde plazmin aktivitesini hızlandırma üzerine yürütülmüş denemeler başarı ile sonuçlanmıştır (Bastian ve ark., 1997). Plazmin tat bakımından aktif olmayan çok sayıda orta büyüklükteki peptidlerin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Farkye ve Fox, 1992). Bu peptidler, olgunlaşma sürecinde peynir ortamına hakim olan LAB tarafından ileri derecede hidrolize edilebilir.

Sütte bulunan diğer bir enzim olan katepsin D asit proteinazlar grubundadır (Hurley ve ark., 2000). Katepsin D, α_{s1}- ve β-kazein üzerinde kimozin ile benzer özellik göstermektedir, ancak, α_{s2}-kazein üzerindeki etkisi kimozinden farklı olmaktadır (McSweeney ve ark., 1995). Peynirde katepsin D'nin düşük seviyede bulunması ve daha fazla bulunan kimozinin baskılayıcı etkisinden dolayı peynir mayası kullanılarak üretilen peynirde gerçekleşen proteolizde katepsin D'nin katkısının değerlendirmesi zor olmaktadır. Katepsin D aktivitesi, kimozinin çoğunun inaktive olduğu yüksek sıcaklıkta ısıtılmış sert peynir çeşitlerinde α_{s1}-kazeinin parçalanmasına düşük oranda katkıda bulunabilir (Ardö ve ark., 2017). Süt çeşitli diğer proteinazları da içermektedir, ancak, bunların peynirde gerçekleşen proteoliz üzerindeki etkileri belirlenmemiştir.

2.3.3. Mikroorganizmalar

LAB gelişimleri için kompleks amino asit gereksinimleri olan organizmalardır. Sütteki amino asitlerin miktarı yüksek düzeyde LAB'nin gelişmesini sağlamak için oldukça düşüktür. LAB, sütte geliştikleri zaman beslenme gereksinimlerini karşılamak amacıyla kompleks protein sistemleri kazeini kısa boyutlu peptidlere ve amino asitlere parçalamaktadır ve peynir aromasının gelişmesine katkıda bulunmaktadır (Steele, 1995). Süt ürünlerinin fermantasyonunda starter kültürler olarak kullanılan LAB arasında proteolitik sistemi en çok çalışılmış olan bakteri *Lactococcus lactis*'tir ve bunu termofilik *Lactobacillus*'lar takip etmektedir (Ardö ve ark., 2017). Ayrıca peynirin olgunlaşması sırasında genel olarak starter olmayan mikrobiyotada baskın olan mezofilik *Lactobacillus* spp.'nin proteolitik sistemleri de ilgi çekmiştir (Williams ve Banks, 1997). Buna ek olarak, küfle olgunlaştırılmış, yüzey olgunlaştırılmış ve İsviçre tipi peynirlerde propiyonik asit bakterileri (PAB), yüzey bakterileri, mayalar ve küfler gibi LAB dışındaki mikroorganizmalar da olgunlaşmada temel rolü oynamaktadır (Ardö ve ark., 2017).

LAB ait proteolitik sistemin ana bileşenleri; hücre duvarı ilişkili proteinazlar (laktosepinler, PrtP), peptid transport sistemleri ve bir dizi hücre içi peptidazdan oluşmaktadır. LAB'lerin sütte gelişmesi sırasında, kazein hidrolizindeki ilk aşama laktosepin tarafından gerçekleştirilmektedir ve oluşan kısa peptidler taşıma sistemi vasıtasıyla hücre tarafından alınmaktadır (Juillard ve ark., 1995). Ancak peynir olgunlaşmasında laktosepinin rolü biraz farklı olmaktadır. Koagülant ve plazminler ile kazeinin ilk hidrolizinde uzun veya orta büyüklükte peptidler meydana gelmektedir ve bu peptidler de laktosepinlerin substratı olarak kullanılmaktadır (Fox ve McSweeney, 1996).

Starter kültürlere ait enzimler proteolizde ve ayrıca olgunlaşma sırasında önemli bir rol oynamaktadır. Özelikle bakteriyel hücre duvarının zarar görmesiyle hücre içi enzimlerin hücre dışı substratlar için kullanılabilir hale getirilmesi önem taşımaktadır. Çok sayıda hücre içi peptidaz enzimi peptidlerden amino asit oluşumunu katalize etmektedir (Christensen ve ark., 1999). Dolayısıyla, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde lize olan bakteriler de proteolize önemli bir katkı sağlamaktadır.

2.3.4. Mikrobiyal enzimler

2.3.4.1. Laktik asit bakterilerine ait proteinazlar

Laktik asit bakterilerinin ana proteinazlarından olan laktosepin enzimi laktokok hücrelerinin dışında bulunmaktadır. Laktosepinin moleküler kütlesi yaklaşık 140 kDa olup, optimum pH'sı ise 5.5-6.5'tir (Ardö ve ark., 2017). *Lactococcus (Lc.)*'a ait laktosepinler, başlangıçta P_I- ve P_{III}-tipi proteinazları olarak 2 ana grup altında sınıflandırılmıştır (Tan ve ark., 1993). P_I-tipi enzimler β-kazeini hızlı bir şekilde parçalamaktadır, ancak α_{s1}-kazein üzerinde yavaş bir etkiye sahiptir. P_{III}-tipi proteinazlar ise β-kazeini P_I-tipi suşlardan farklı bir şekilde hidrolize etmekle birlikte etkili bir şekilde α_{s1}- ve κ-kazeinleri de hidrolize etmektedir (Fox ve McSweeney, 1996; Law ve Haandrikman, 1997).

Laktokok hücrelerindeki laktosepinlere benzer özelliklere sahip olan hücre duvarı ilişkili proteinazlar (CEP) çok sayıda *Lactobacillus* (*L.*) suşundan izole edilmiştir (Law ve Haandrikman, 1997; Christensen ve ark., 1999). Her *Lc. lactis* suşunda yalnızca bir laktosepin geni belirlenmiştir, ancak, *L. helveticus*'ta 0-4 farklı gen tespit edilmiştir (Broadbent ve ark., 2011). Farklı *L. helveticus* suşlarının α_{s1}-kazein (f1-23) peptidinde parçaladıkları ilk bağların farklılık gösterdiği bildirilmiştir. α_{s1}-kazein üzerinde hücrelerin aktivitesi suşlara bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Jensen ve ark., 2009).

Genellikle sütten ya da üretim yapılan çevreden peynire geçen mezofilik *Lactobacillus* cinsleri çoğunlukla *L. paracasei/casei*, *L. plantarum* ve *L. curvatus* türlerini kapsamaktadır. Bu türler, peynirde yüksek sayıda çoğalmaktadırlar, ancak, muhtemelen düşük hücre duvarı proteinazı aktivitesinden dolayı sütte iyi bir şekilde gelişmemektedirler (Ardö ve ark., 2017)

2.3.4.2. Laktik asit bakterilerine ait peptidazlar

Sütte veya peynirde bulunan kazein laktosepin tarafından oligopeptidlere hidrolize edilirken, bu peptidlerin amino asitlere ileri derecede hidrolizi peptidazlar tarafından katalizlenmektedir (Ardö ve ark., 2017). LAB'den çeşitli peptidazlar izole edilmiştir ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Law ve Haandrikman, 1997; Christensen ve ark., 1999). Endopeptidazlar oligopeptidleri daha kısa olan peptidlere parçalarken, ekzopeptidazların fonksiyonu sınırlı boyuttaki peptidlerden bir veya iki

amino asidin açığa çıkmasını sağlamaktır. Peptidazlar substrat özgüllüklerine göre hücre içi endopeptidazlar, tri- ve dipeptidazlar, x-propil dipeptidil aminopeptidazlar, iminopeptidazlar, aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak gruplandırılmaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Lactococcus ve *Lactobacillus*'ta belirlenen çoğu endopeptidaz monomerik metallopeptidazlardır. Substrat özgüllüğüne dayanarak LAB'nin en 3 tip endopeptidaza sahip olduğu öne sürülmüştür (Monnet ve ark., 1994). PepO enzimi, ilk gen sekanslamasının yapıldığı laktokok hücrelerine ait endopeptidazdır (Mierau ve ark., 1993). PepO, moleküler kütlesi yaklaşık 70 kDa olan bir monomerik metallopeptidazdır ve çeşitli kazein fragmentlerinin hidrolize etme yeteneğine sahiptir, ancak, di-, tri- ve tetra-peptidleri hidrolize edememektedir. Monnet ve ark. (1994) *Lc. lactis* subsp. *lactis* NDCO 763'ten PepF olarak adlandırılan oligopeptidaz saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. Yaklaşık 70 kDa'luk bir monomerik metallopeptidaz olan PepF'nin geniş bir spesifite ile 7-17 amino asit içeren peptidleri hidrolize edebildiği, ancak daha küçük ya da büyük peptidler üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir. Fenster ve ark. (1997) *L. helveticus* CNRZ32'den bir endopeptidaz olan PepE'yi izole etmiş ve karakteristik özelliklerini belirlemişlerdir. Yaklaşık 60 kDa'luk moleküler kütleye sahip PepE'nin diğer metallopeptidaz enzimlerden (PepO ve PepF) farklı olduğunu tespit etmişler ve bu enzimin α-, β- ve κ-kazeinler üzerinde etkili olmadığını gözlemlemişlerdir.

LAB'den saflaştırılan tripeptidazlar (PepT) genellikle asidik, bazik veya nötral N terminal amino asit R gruplarını bulunduran tripeptidleri hidrolize edebilme yeteneğine sahip geniş bir spesifitesi olan metallopeptidazlardır (Ardö ve ark., 2017). Ayrıca, sadece dipeptidleri hidroliz eden geniş bir spesifiteye sahip bir peptidaz olan PepV, LAB'de belirlenmiştir (Law ve Haandrikman, 1997). LAB'den izole edilen dipeptidazların çoğu, 40-55 kDa aralığında bir moleküler kütleye sahiptir. Prolinaz (PepR), Pro-X sekansına sahip dipeptidleri hidrolize eden bir dipeptidazken, prolidaz ise (PepQ), bir X-Pro spesifik dipeptidazdır (Ardö ve ark., 2017).

X-Propil dipeptidil aminopeptidaz (PepX), oligopeptidlerin N terminal bölgesinden X-Pro dipeptidini ve bazen de X-Ala dipeptidini meydana getirebilen bir peptid hidrolazdır. Meydana gelen peptidler, prolidaz (PepQ) enzimi tarafından gerçekleştirilen ileri bir hidroliz ile serbest amino asitlere dönüşebilir. LAB'lerinde belirlenen PepX çok sayıda suştan izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Georgalaki ve ark., 2002).

LAB'de en çok incelenen aminopeptidaz, PepN'dir. Çalışılan çoğu suştaki bu enzim 85-98 kDa'luk bir metallopeptidazdır ve geniş bir spesifiteye sahiptir (Ardö ve ark., 2017). Bu enzim hem boyutu hem de amino asit bileşimi bakımından farklı olan çok sayıda peptidi hidrolize edebilmektedir. β-kazeinin triptik parçalanması sonucunda meydana gelen acılığın azaltılmasında *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2'den elde edilen PepN'in ilave edilmesinin etkili olduğu gösterilmiştir (Tan ve ark., 1993). Çünkü, bu enzim N terminalinde bir hidrofobik veya bazik amino asit R grupları bulunan substratları hidroliz ederek acılığı gidermektedir.

Prolin iminopeptidazı (PepI), di-, tri- ve oligopeptidlerden N terminal prolinin meydana gelmesini katalize etmektedir (Ardö ve ark., 2017). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397 ve *L. casei* subsp. *casei* LLG gibi laktik asit bakterilerinden çeşitli PepI enzimi izole edilmiştir (Gilbert ve ark., 1994; Habibi-Najafi ve Lee, 1995). Karboksipeptidazlar ise, peptidlerin C terminal bölgesinden hidrolizini katalizleyen ekzopeptidazlardır. *Lactococcus* cinslerinde hiç karboksipeptidaz aktivitesi belirlenmemiştir, ancak mezofilik *Lactobacillus* suşlarında N terminal bölgesi bloke olmuş peptidlere karşı aktiviteler gösteren karboksipeptidazlar tanımlanmıştır (Ardö ve ark., 2017).

2.3.4.3. Propiyonik asit bakterilerine ait proteolitik enzimler

Propionibacterium (*P.*) spp. zayıf proteolitik aktivite göstermektedir, ancak özellikle fenilalanin ve prolin içeren peptid bağları üzerinde sahip olduğu iminopeptidaz enzimi (PepI) ile yüksek peptidolitik aktiviteye sahiptirler (Ardö ve ark., 2017). Dolayısıyla propiyonik asit bakterisi içeren peynirlerin karakteristik tatlı lezzetine katkıda bulunan tatlı prolin amino asidinin meydana gelmesine neden olmaktadırlar. Tobiassen ve ark. (1996)'nın *P. freudenreichii* ATCC9614 suşundan izole ettikleri endopeptidaz enziminin 5 ve 23 amino asit içeriğine sahip peptidler üzerinde etkili olduğunu, uzun peptid zincirleri üzerinde düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Fernandez-Espla ve Fox (1997) tarafından *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* NCDO 853'ten moleküler kütlesi 84 kDa olan ve optimum aktivitesini pH 7.0 ve 40 °C'de gösteren bir PepX enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Ayrıca, *P. freudenreichii*'den optimum aktivitesini pH 6.5-7.5 ve 40-50 °C'derecede gösteren PepF olarak karakterize edilen endopeptidazlar izole edilmiştir (Tobiassen ve ark., 1996; Fernandez-Espla ve Fox, 1997).

2.3.4.4. Yüzey mikrobiyotasına ait proteolitik enzimler

Olgunlaşma süresinin başında Danbo, Tilsit, Limburger, Münster ve Taleggio gibi peynirlerin yüzey mikrobiyotasına aside ve tuza dayanıklı mayalar hakimdir. Olgunlaşmanın ilerleyen zamanlarında ise *Brevibacterium (B.)*, *Arthrobacter* ve *Corynebacterium* cinsi bakteriler dominant olmaktadır (Valdés-Stauber ve ark., 1997). Peynir yüzeyinde *B. linens*'in gelişimi, yüzey olgunlaştırılmış peynir çeşitlerinin renk, lezzet ve aromasının gelişiminde önemli roller oynadığı için bu bakteriye ait enzimler karakterize edilmiştir (Rattray ve Fox, 1999). *B. linens*'in hücre dışı enzimleri proteinazları ve aminopeptidazları içermektedir ve bu enzimlerin biyokimyasal özellikleri türler içinde bulunan suşlar arasındaki farklılıklardan dolayı değişiklik göstermektedir (Ardö ve ark., 2017). *B. linens* ayrıca hücre dışı aminopeptidazları, hücre içi peptidazları ve proteinazları üretmektedir. Curtin ve ark. (2002), yüzey olgunlaştırılmış peynirlerden izole edilen brevibacteria, corynebacteria, staphylococci ve brachybacteria suşlarında aminopeptidaz, dipeptidaz ve tripeptidaz aktivitelerinin bulunduğunu bildirmiştir.

Arthrobacter cinsine ait türler, Brie ve Camembert gibi yüzeyi küfle olgunlaştırılmış peynirlerin ve kırmızı yüzey olgunlaştırılmış peynirlerin mikrobiyotasının başlıca bileşenidir (Ardö ve ark., 2017). Smacchi ve ark. (1999) *Arthrobacter nicotianae* 9458'den SDS-PAGE ile moleküler kütlesi yaklaşık 53-55 ve 70-72 kDa olarak belirlenen iki hücre dışı serin proteinaz saflaştırmıştır. Bu enzimlerin optimum aktivitesini gösterdiği sıcaklıklar sırasıyla 55–60 ve 37 °C olarak belirlenmiştir. Her iki enzimin de optimum aktiviteye sahip olduğu pH aralığının 9.0-9.5 olduğu ve α_{s1}-kazeinden ziyade β-kazeini hidrolize etme eğilimi gösterdikleri bildirilmiştir.

Bazı *Micrococcus* türleri yüksek düzeyde proteolitiktir ve hücre dışı proteinazlarla birlikte hücre içi proteinazları ve peptidazları üretmektedir (Ardö ve ark., 2017). Nath ve Ledford (1972) belirli mikrokoklardaki hücre dışı proteinazların özellikle α_s-kazeinleri hidrolize ettiğini bildirmiştir.

2.3.4.5. Küflere ve mayalara ait proteolitik enzimler

Camembert ve Roquefort gibi yüzey olgunlaştırılmış ve mavi damarlı peynirlerin mikrobiyotası mayaları, küfleri, laktokokları, laktobasilleri, mikrokokları ve coryneform bakterilerini içermektedir (Ardö ve ark., 2017). *Penicillium* spp. mikrobiyotanın ana

bileşenidir ve enzimleri peynir olgunlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. *P. camemberti* ve *P. roqueforti*'nin proteolitik sistemleri biraz benzerdir, her iki proteolitik sistem de bir aspartil proteinaz, bir metalloproteinaz, bir asit karboksipeptidaz ve bir alkalin aminopeptidaz sentezlemektedir (Ardö ve ark., 2017). *P. camemberti*'de bulunan aspartil proteinaz β-kazeinden ve κ-kazeinden daha hızlı bir şekilde α_{s1}-kazein hidrolize etmektedir (Gripon, 1993). Chrzanowska ve ark. (1995) *P. camemberti*'den bir aspartik proteinaz saflaştırmışlardır ve 33.5 kDa'luk moleküler kütleye sahip olan bu proteinazın hidrofobik bir amino asit içeren peptid bağlarına karşı spesifiklik gösterdiği bildirilmiştir. *Penicillium*'un gelişimi, asit proteinazın aktivitesi ve acı peptidlerin meydana gelmesi arasında net bir ilişki kurulmuştur. Bu acı peptidlerin hidrolizi için, *Penicillium* özellikle hidrofobik amino asitleri açığa çıkaran bir hücre dışı asit karboksipeptidaza sahiptir ve dolayısıyla acılık giderme işleminde önem taşımaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Geotrichum candidum hücre dışı ve hücre içi proteinazları sentezlemektedir, ancak, bu enzimlerin peynir olgunlaşmasına katkısı *Penicillium* spp.'deki enzimlerden daha az olmaktadır (Gripon, 1993). Birkaç *Candida* suşu için proteolitik aktivite tespit edilmiştir, ancak, bu aktivitenin düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Klein ve ark., 2002). *G. candidum*, genellikle beyaz küflü ve yüzey olgunlaştırılmış peynirlerin yüzeyinde bulunmaktadır. *G. candidum*, peynirde gelişirken pH'yı artırabilir, böylece *P. camemberti'nin* gelişmesine imkan sağlamaktadır ve artan pH'ya bağlı olarak asit proteinazın etkisini sınırlanmaktadır (Ardö ve ark., 2017). Mavi damarlı peynirlerde bulunan *D. hansenii*'ye ait 6 suşun hiçbirinde kazein üzerinde aktivite belirlenememiştir (Van den Tempel ve Jakobsen, 2000). Ancak mavi damarlı peynirden izole edilen *Y. lipolytica*'nın spesifik suşlarının peynirde aşırı düzeyde gerçekleşen proteolize katkıda bulunma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir. *D. hansenii* ve *Y. lipolytica*'da dallı zincirli amino asitler üzerinde aminoopeptidaz aktivitesi belirlenmiştir ve bu mayalar mavi damarlı peynirlerde yüksek sayıda gelişirlerse aminoopeptidaz aktivitesi ile amino asitlerin meydana gelmesine neden olabilmektedir (Klein ve ark., 2002).

2.4. Olgunlaşma Süresince Peynirde Gerçekleşen Proteolizin Belirlenmesi

Peynirde gerçekleşen proteolizi tahmin edebilmek için çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir (McSweeney ve Fox, 1997). Geleneksel yaklaşım; farklı çözücüler, santrifügasyon ve filtrasyon teknikleri kullanılarak peynirde bulunan azotun fraksiyonlanmasını içermektedir. Genellikle, azot fraksiyonlaması; suda, pH 4.6'da

etanolde, trikloroasetik asitte (TCA) ve fosfotungustik asitte (PTA) çözünme durumları göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (Ardö, 1999). Bu şekilde elde edilen fraksiyonlarda, genel olarak Kjeldahl yöntemi kullanılarak N içeriği belirlenmektedir. Kjeldahl metodu N içeriğini yüksek doğrulukla analiz etmektedir, ancak, oldukça zaman almaktadır ve potansiyel olarak tehlikeli bir tekniktir. Bu analiz tekniğini daha hızlı yöntemlerle değiştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Proteoliz miktarının belirlenmesi için kullanılan birtakım teknikler, peptid bağlarının yıkılmasıyla açığa çıkan amino gruplarının farklı reaktiflerle reaksiyona girmesine dayanmaktadır. Bu analizlere dayanarak, çeşitli reaktifler ile reaksiyona giren amino gruplarının miktarı belirlenmektedir (Wallace ve Fox, 1998).

Kromatografik ve elektrofotometrik metotlar peynir olgunlaşması sırasında kazeinin, peptidlerin ve amino asitlerin dinamik kompozisyonunu analiz etmek için kullanılmaktadır. Üre poliakrilamid jel elektroforezi (üre-PAGE) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), özellikle peynir olgunlaşmasının erken safhalarında proteolizi takip etmek ve farklı peynir çeşitlerinin kazein hidrolizi modellerini karşılaştırmak için kullanılmaktadır (Jin ve Park, 1996; Ardö ve ark., 2007). Peynirde meydana gelen peptidler, SDS- veya üre-PAGE ile ayrılabilmektedir ve bu peptidler bantların kesilmesi veya elektroblotlama ile izole edilmektedirler. Sonrasında izole edilen peptidlerinin N terminal sekansı Edman sekanslama veya kütle spektrometresi ile belirlenebilmektedir (Singh ve ark., 1997; Michaelidou ve ark., 1998; Ardö ve ark., 2007).

Kapiler jel elektroforezi, farklı genetik kazein çeşitleri ve bunlardan meydana gelen büyük peptidler de dahil olmak üzere, peynirin kazein fraksiyonu bileşenlerini ayırmak için kullanılan mükemmel bir tekniktir (Otte ve ark., 1999). Kazein parçalanmasının ilk aşamaları olan kimozinin α_{s1}-kazein ve plazminin β-kazein üzerindeki etkisi kapiler jel elektroforezi kullanılarak başarılı bir şekilde incelenmiştir ve peynirler arasındaki karakteristik farklar ortaya konulmuştur (Roseiro ve ark., 2003; Børsting ve ark., 2012).

İyon değiştirme (IEC), boyut dışlama veya moleküler eleme (SEC), ters faz (RP), hidrofilik etkileşim (HILIC) ve immobilize metal afinitesi (IMAC) gibi birtakım yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği, peptid profilini belirlemek için kullanılan analitik teknikler olarak peynir ekstraktlarının fraksiyonlanmasında kullanılmaktadır (McSweeney ve Fox, 1997; Lund ve Ardö, 2004). İyon değiştirme ve boyut dışlama veya moleküler eleme teknikleri kazein kaynaklı büyük peptidlerinin

fraksiyonlanması için uygun olmaktadır (Ardö ve ark., 2007). RP-HPLC, suda çözünür peptidleri ayırmak için kullanılan üstün bir yöntemdir ve çeşitli olgunlukta ve kalitedeki peynirlerde gerçekleşen proteolizin derecesini belirlemek ve karşılaştırmak için kullanılmaktadır, ayrıca çeşitli peynir üretimi parametrelerinin proteoliz üzerindeki etkisini incelemek için de faydalanılmaktadır (Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Gómez-Ruiz ve ark., 2007; Timón ve ark., 2019). Ayırma sırasında karışan bazik peptidlerin uzaklaştırılması için kullanılan bir katyon kromatografisinden sonra peynirdeki fosfopeptidlerin analizinde Fe(III) metal afinite kromatografisinin kullanılması yararlı olmaktadır (Lund ve Ardö, 2004).

2.5. Proteoliz ile Meydana Gelen Peptidlerin Sekanslanmasında Kullanılan Yöntemler

HPLC kromatogramları, zirve noktalarına kıyasla çok daha yüksek sayıda peptidi temsil etmektedir, ancak, ortamdaki peptidlerin moleküler ağırlıkları belirlemek için çevrimiçi (online) kütle spektrometresi (MS) kullanılarak peptidler tanımlanabilmektedir. Amino asit sekansları, tandem MS-MS kullanılarak belirlenebilir ve amino asitlerin ve küçük peptidlerin bileşenleri benzer molekül ağırlıklı moleküllerin tanımlanması için ek bilgileri kapsayan MS^3 (MS-MS-MS) ile analiz edilebilir. Kütle spektrometresi, olgunlaşma sırasında peynirde oluşan ve bu süreçte ileri parçalanmayla da meydana gelen çok sayıda peptidin tanımlanmasını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Peptidleri karakterize etmek için çoğunlukla kütle spektrometresi kullanılmaktadır. Genellikle, proteomik araştırmalarda LC-MS-MS kullanılmaktadır, çünkü nispeten kısa bir analiz süresi ile çok sayıda peptidin sekanslanmasını mümkün kılmaktadır. Bu teknik, peynir ekstraksiyonlarından peptidlerin tanımlanması için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Alli ve ark., 1998; Sommerer ve ark., 2001).

Alli ve ark. (1998), Cheddar peynirinde meydana gelen peptidleri LC-MS/MS kullanarak belirlemişlerdir. Olgunlaşma süresince, Cheddar peynirinde α_{s1}-kazein kaynaklı 13 peptid, β-kazein kaynaklı 7 peptid ve κ-kazein kaynaklı 5 peptid tanımlamıştır, ancak, α_{s2}-kazein kaynaklı peptidlere rastlanılmamıştır. Diğer bir çalışmada ise, 1 yıl olgunlaştırılan Cheddar peynirinin suda çözünebilir ekstraktlarındaki peptidler RP-HPLC ile fraksiyonladıktan sonra MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak tanımlanmıştır (Gouldsworthy ve ark., 1996). Bu yöntemle Cheddar

peynirinin suda çözünebilir ekstraktlarında 8'i α_{s1}-kazein kaynaklı, 7'si β-kazein kaynaklı ve 1'i α_{s2}-kazein kaynaklı toplam 16 peptid tanımlanmıştır.

Gómez-Ruiz ve ark. (2004), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirinden elde edilen suda çözünebilir ekstraktlarda RP-HPLC-MS/MS kullanarak moleküler kütlesi 3000 kDa'nın altında 75 peptid tanımlamışlardır ve bu peptidlerden bazılarının antihipertansif aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Manchego peynirinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise 1000 kDa'nın altındaki peptidler gene RP-HPLC-MS/MS kullanılarak tanımlanmıştır (Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Bu çalışmada α_{s1}-, α_{s2}- ve β-kazein kökenli toplam 107 adet peptid belirlenmiştir. Azalan moleküler kütleye bağlı olarak tanımlanan peptid sayısında da azalmalar meydana gelmektedir.

Fontenele ve ark. (2017), Coalho peynirinden elde ettikleri suda çözünebilir ektraktlardaki peptidleri RP-HPLC ile fraksiyonladıktan sonra MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada 116 peptid tanımlaması gerçekleştirilmiştir ve elde edilen peptidlerden bazılarının antihipertansif, antimikrobiyal ve bağışıklık düzenleyici aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Silva ve ark. (2016) Coalho peynirinin suda çözünebilir ektraktlarındaki peptid profilini Ettan MALDI-TOF-Pro ile belirlemişler ve α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein kökenli toplam 72 adet peptid tanımlamışlardır.

Losito ve ark. (2006) farklı İtalyan peynirlerinden elde ettikleri suda çözünebilir ekstraktlardan FPLC sistemi ile 45 fraksiyon elde etmişlerdir ve bu fraksiyonlardaki peptidleri HPLC-ESI-IT-MS^3 kullanarak tanımlamışlardır. Gene çeşitli İtalyan peynirlerinden elde edilen suda çözünebilir ekstraktlarda HPLC-ESI-IT-MS^2 kullanılarak antibakteriyal özellikli peptidler tanımlanmıştır (Rizzello ve ark., 2005).

Sagardia ve ark. (2013), çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılmış olan Idiazabal peynirinden elde ettikleri ekstraktları kuvvetli katyon değişim kromatografisi ve RP-HPLC ile fraksiyonladıktan sonra MALDI-TOF-MS ile 231 peptid tanımlanmıştır.

Sommerer ve ark. (2001) keçi peynirlerinden elde edilen suda çözünebilir ekstraktlardaki oligopeptidleri sırasıyla boyut dışlama kromatografisi, anyon değişim kromatografisi ve yarı preparatif RP-HPLC ile ayırdıktan sonra LC-ESI-MS/MS kullanarak 28 adet peptid sekanslamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tulum peyniri örneklerinin toplanması ve olgunlaştırılması

Orta Toroslar bölgesinde bulunan Konya-Ereğli, Karaman, Mersin-Mut, Mersin-Anamur yörelerinden geleneksel yöntemler kullanılarak çiğ sütten (starter kültür kullanılmadan) üretilen deri tulum peynirleri üretimi takiben üreticilerden soğuk zincir sağlanarak temin edilmiştir. Bu kapsamda, yukarıda belirtilen 4 lokasyon, 5 farklı olgunlaştırma süresi ve 3 biyolojik tekerrür göz önünde bulundurularak toplam 60 adet (4*5*3) yaklaşık 3-3.5 kg'lık deri tulum peynirleri üreticilere ürettirilmiştir. Deri tulum peynirleri geleneksel üreticilerle benzer şartlar altında olgunlaştırmaya bırakılmıştır. Peynir örnekleri fazla suyu uzaklaştırmak amacıyla önce 15 °C'de 5 gün olmak üzere ön olgunlaştırmaya tabi tutulmuştur. Ön olgunlaştırma işlemini takiben, örnekler Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda İşleme Pilot Tesisinde bulunan soğuk hava kabininde 4-6 °C ve %85 nispi nem koşulları altında 180 gün boyunca olgunlaştırmaya bırakılmıştır. Mikrobiyal ve enzimatik aktivitelerin etkinliği göz önünde bulundurularak örnek alma zamanları olgunlaştırma süresinin 7., 30., 60., 90. ve 180. günleri olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Örneklerin analize hazırlanması

Olgunlaştırma süresinin 7., 30., 60., 90. ve 180. günlerinde soğuk hava kabininden deri tulum peynirleri alınmış ve tüm kitleyi temsil etmek amacıyla tulum peynirinin derisi uzaklaştırılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra örnekler analizlere hazırlanmıştır. Her olgunlaştırma periyodunda Konya-Ereğli, Karaman, Mersin-Mut ve Mersin-Anamur bölgelerinden üçer biyolojik örnek alınarak toplam 12 adet deri tulum peyniri kullanılmıştır. Tüm analizler olgunlaştırma periyodu boyunca gerçekleştirilmiştir. Elektroforez analizleri ve kromatografik analizler yapılana kadar belirlenen olgunlaştırma günlerinde homojen bir şekilde alınan peynir örnekleri vakum ambalajlı olarak -20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fizikokimyasal analizler

3.2.1.1. pH değerlerinin belirlenmesi

10 g peynir örneği ile 10 ml distile su karıştırılmış ve Ultra Turrax karıştırıcı (Ultra-Turrax® T25; IKA, Almanya) kullanılarak homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu karışımın pH değerleri, kalibrasyonu yapılmış el tipi dijital pH-metrenin (WTW-315i set, Almanya) elektrodu daldırılarak ölçülmüştür (Hannon ve ark., 2003).

3.2.1.2. Titrasyon asitliğinin (%LA) belirlenmesi

Titrasyon asitliği Kurt ve ark. (1993) tarafından bildirilen alkali titrasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar % laktik asit (%la) cinsinden verilmiştir.

3.2.1.3. Kuru madde oranının belirlenmesi

Peynir örneklerinde kuru madde oranı gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla, kuru madde oranı 5 g peynir örneğinin 103±2 ºC'de etüvde (Nüve dry sterilizer, Türkiye) sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar kurutulması ile tespit edilmiştir ve sonuçlar % kuru madde olarak verilmiştir (Kurt ve ark., 1993)

3.2.1.4. Yağ oranının belirlenmesi

Peynir örneklerinin yağ oranları Van Gulik bütirometreleri kullanılarak Gerber metodu ile belirlenmiştir ve sonuçlar % yağ olarak verilmiştir (Kurt ve ark., 1993).

3.2.1.5. Tuz oranının belirlenmesi

Peynir örneklerinin tuz oranları Mohr Titrasyon yöntemine göre tespit edilmiştir. Titrasyona koyu kırmızı kiremit renk oluşuncaya kadar devam edilmiştir ve sonuçlar % tuz olarak verilmiştir (Kurt ve ark., 1993).

3.2.1.6. Kül oranının belirlenmesi

Peynir örneklerinde kül oranı gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Yaklaşık 3 g peynir örneği krozelere hassas olarak tartılmıştır ve krozeler öncelikle etüvde (Nüve dry sterilizer, Türkiye) 105 °C'de 1 saat kurutulmuştur. Kurutulan örnekler, kül fırınına (Selecta, Almanya) yerleştirilerek 550 °C'de tamamen kül rengine dönene kadar yakılmıştır. Yakma işlemini takiben desikatöre soğutulan örnekler tartılıp % kül oranı hesaplanmıştır (Kurt ve ark., 1993).

3.2.1.7. Su aktivitesinin belirlenmesi

Tulum peyniri örneklerinin su aktivitesi (a_w) değerleri AquaLab 3 TE (Amerika) cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.1.8. Protein oranının belirlenmesi

Kjeldahl yöntemi ile bulunan toplam azot oranının 6.38 faktörü ile çarpılması sonucu protein oranı hesaplanmıştır ve sonuçlar % protein oranı olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.9. Toplam azot oranının belirlenmesi

Toplam azot oranı tayini Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir (Kurt ve ark., 1993). Sonuçlar % azot oranı olarak verilmiştir (Kurt ve ark., 1993).

3.2.1.10. Suda çözünebilir azot oranının belirlenmesi

Kromatografik analizler için hazırlanan suda çözünebilir ekstraktlarının azot oranları, diğer bir ifade ile peynir örneklerinin suda çözünebilir azot oranları Kjeldahl yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar % suda çözünebilir azot olarak verilmiştir (Kurt ve ark., 1993).

3.2.1.11. Kazein azotu oranının belirlenmesi

Kazein azotu oranı, toplam azotlu madde oranından suda çözünen azotlu madde oranının çıkarılıp elde edilen sonucun toplam azot miktarına oranlanmasıyla belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar % kazein azotu olarak verilmiştir (Argumosa ve ark., 1992).

3.2.1.12. Olgunlaşma derecesinin belirlenmesi

Suda çözünen azot miktarının toplam azot miktarı ile oranlanmasıyla toplam azot içerisindeki suda çözünen azot oranı, diğer bir ifade ile olgunlaşma derecesi aşağıdaki formül kullanılarak tespit edilmiştir (Venema ve ark., 1987):

$$\text{Olgunlaşma derecesi} = \frac{\%\ \text{Suda çözünür azot}}{\%\ \text{Toplam azot}} \times 100 \qquad \text{Denklem 3.1.}$$

3.2.2. Elektroforez analizleri

Tulum peynirlerinde bulunan α_s-, β- ve κ-kazeinin hidroliz durumunu saptamak ve proteolitik deseni belirlemek amacıyla Laemmli (1970) tarafından belirtilen SDS-PAGE yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 4X Laemmli örnek tampon çözeltisi yerine 1X Laemmli örnek tampon çözeltisi kullanılmıştır. SDS-PAGE analizinde %4'lük üst veya yığma jel tamponu ve %12'lik alt veya ayırıcı jel tamponu kullanılmıştır. SDS-PAGE analizi için peynir proteinleri Barać ve ark. (2013) tarafından tarif edilen metotta bazı değişiklikler yapılarak ekstrakte edilmiştir. Tulum peyniri örneklerinden protein izolasyonu amacıyla öncelikle %2 SDS (ağırlık/hacim), %7 gliserol (hacim/hacim), %5 β-merkaptoetanol (hacim/hacim) içeren ve 0.055 M Tris base kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanan tampon çözelti hazırlanmıştır. Homojen bir örnek almak için önceden küçük parçalara öğütülmüş olan 1 gr tulum peyniri örneği 15 mL tampon çözelti ile karıştırılmıştır. Kazeinlerin çözünmesini sağlamak amacıyla karışım 200 rpm'de ve 40 °C'de 60 dk boyunca tutulmuştur. Bu işlemi takiben, örnekler 5000 rpm'de ve 4 °C'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası örnekler Whatman No. 1'den süzülmüştür ve elde edilen süpernatantlar analiz için kullanılmıştır.

1X Laemmli örnek tampon çözeltisi %2.5 SDS (ağırlık/hacim), %0.002 brom fenol mavisi (ağırlık/hacim), %10 gliserol (hacim/hacim), %5 β-merkaptoetanol (hacim/hacim) ve %6.25 0.5 M TrisHCl (pH 6.8) (hacim/hacim) ile hazırlanmıştır. Elde edilen protein ekstraktları hazırlanan 1X Laemmli örnek tampon çözeltisi ile 1:4 (hacim:hacim) oranında karıştırılmıştır ve ardından 100 °C'de 5 dk ısıl işlem uygulanarak örnekler denatüre edilmiştir. Hazırlanan örnekler oda sıcaklığına ulaşınca örneklerden 5 µL alınarak jellere yüklenmiştir. Ayrıca çalışmada geniş aralıklı moleküler ağırlık standardı (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder-10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 ve 170 kDa) kullanılmıştır ve 5 µL moleküler kütle standardı örneklerin yüklendiği jelin ilk kuyucuğuna yüklenmiştir. Jeller 1X elektrot tamponu (running buffer) ile doldurulan elektroforez tankında (Bio-Rad, Mini-PROTEAN) sabit akımda ve 100 V gerilimde (PowerPack, Bio-Rad) 2 saat yürütülmüştür. Proteinlerin jel içindeki hareketleri, brom fenol mavisinin meydana getirdiği renkli çizgi hareketi ile takip edilmiştir. Bu çizgi jelin en alt kısmına ulaşıncaya kadar elektroforeze devam edilmiştir. Ardından %0.1 Coomassie Blue R-259 (ağırlık/hacim), %50 metanol (hacim/hacim) ve %10 asetik asit (hacim/hacim) karıştırılarak boyama çözeltisi hazırlanmıştır. Elektroforez işlemini takiben örnekler 45 dk boyunca boyama çözeltisinde tutulmuştur. Boyama işleminin ardından örnekler %5 metanol ve %7 asetik asit ile hazırlanan boya giderici çözelti içerisinde 20 dk tutularak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Boyası uzaklaştırılan jellerin Bio-Rad ChemiDoc XRS cihazında UV taraması yapılarak görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Görüntüler Image Lab yazılımı (Bio-Rad) ile protein bantlarının moleküler ağırlığını analiz etmek için kullanılmıştır. Elektroforetik bantların yoğunluğu % olarak belirlenmiştir. Ayrıca, α_s-, β- ve κ-kazein standartları (Sigma-Aldrich) kullanılarak çizilen standart eğrilerden faydalanılarak örneklerin kazein içerikleri mg/g cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.3. Peptidlerin sekanslanması ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi

3.2.3.1. Suda çözünebilir ekstraktların hazırlanması

Suda çözünebilir ekstraktlar, Gómez-Ruiz ve ark. (2002) tarafından belirlenen yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu amaçla, peynir örnekleri ağırlıklarının 5 katı kadar distile su ile karıştırıldıktan sonra Ultra Turrax karıştırıcı (Ultra-Turrax® T25; IKA, Almanya) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 40 °C'de ve 200 rpm'de 60 dk

boyunca su banyosunda tutulmuştur (Memmert WB22, Almanya). Bu işlemi takiben, homojenatların pH'sı 1 M HCl kullanılarak pH 4.6'ya ayarlanmıştır ve ardından örnekler 3800 g'de ve 4 °C'de 30 dk santrifüj edilmiştir (Nüve, NF800R). Elde edilen süpernatantlar öncelikle Whatman No. 40 filtre kağıdından süzüldükten sonra 0.45 µM'lik membran filtreden (Merck Milipore, Durapore, Hidrofilik, PVDF) geçirilerek filtre edilmiştir. Elde edilen suda çözünebilir ekstraktlar LC-MS/MS analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.3.2. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ile peptidlerin analizi ve tanımlanması

Kütle spektrometresi analizleri Chang ve ark. (2013) tarafından belirlenen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, hazırlanan suda çözünebilir ekstraktların LC-MS/MS denemeleri bir ikili pompa, bir otomatik örnek alıcı, bir degazör (gaz giderici) ve bir kolon fırınından oluşan Agilent 1260 HPLC ile donatılmış Agilent 6530 Elektrosprey İyonizasyon (ESI)-QTOF-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektrosprey iyonizasyon pozitif iyon modunda yapılmıştır. Analiz parametreleri olarak gaz sıcaklığı 300 °C, kurutma gazının akış hızı 10 L/dk, nebülizatör gazı akışı 50 psig, kapiler voltaj 4000 V ve fragmentör voltaj 200 V kullanılmıştır. Çarpışma gazı olarak yüksek saflıkta azot (>%99) kullanılmıştır. Örneklerde bulunan her bir bileşiğin tutulma süresini ve parçalanma düzenini belirlemek için örnekler sisteme ayrı olarak enjekte edilmiştir.

Kromatografik ayırma, bir C18 analitik kolonu (Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3×150 mm, 2.7 µm, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin bozulmasını önlemek amacıyla otomatik örnek alıcı + 4 °C'de tutulmuştur. Örnekler 0.22 µm'lik şırınga membran filtreden geçirildikten sonra analizde kullanılmıştır. 2 µL örnek LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir ve örnekler 0.200 mL/dk hızda solvent A'da solvent B'nin linear gradiyenti ile elüt edilmiştir. Solvent A olarak %0.1 formik asit içeren su/asetonitril (98:2, hacim:hacim) ve solvent B olarak %0.1 formik asit içeren su/asetonitril (2:98, hacim:hacim) hazırlanmıştır. LC gradiyenti sırasıyla %2-35 arasında solvent B ile 30 dk, %35-90 arasında solvent B ile 10 dk, %90 solvent B ile 5 dk ve son olarak %5 solvent B ile 15 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen peptidler 200 V iyon sprey (fragmentör) voltajında elektrospreylenmiştir. Kütle verilerinin toplanması Agilent MassHunter 7.0 kalitatif analiz yazılımı ile otomatik olarak

gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumları tam tarama iyon modunda (50-1000 m/z) kaydedilmiştir.

Peptid sekanslarını oluşturmak amacıyla lisanslı Bioconfirm (Bioconfirm for MassHunter Acqusition Data, B.09.00, 2017) programı kullanılmıştır. İlgili programda α_{s1}-kazein, α_{s2}-kazein, β-kazein, κ-kazein, α-laktalbumin, β-laktoglobulin ve serum albüminden oluşan süt proteinleri değerlendirilmiştir. Bioconfirm programına NCBI veri tabanından (www.ncbi.nlm.nih.gov) belirtilen süt proteinlerine ait yayınlanmış amino asit dizileri fasta dosyası halinde eklenerek peptidler tanımlanmıştır. Peptidlerin sekanslanmasında aşağıdaki tabloda belirtilen verilerden faydalanılmıştır.

Çizelge 3.1. Peptidlerin sekanslanmasında kullanmasında NCBI verileri

Kaynak	Protein ismi	NCBI erişim numarası
Koyun	α_{s1}-kazein	NP_001009795
Koyun	α_{s2}-kazein	NP_001009363
Koyun	β-kazein	CAA34502
Koyun	κ-kazein	NP_001009378
Koyun	α-laktalbumin	NP_001009797
Koyun	β-laktoglobulin	NP_001009366
Koyun	Serum albümin	NP_001009376
İnek	α_{s1}-kazein	NP_851372
İnek	α_{s2}-kazein	NP_776953
İnek	β-kazein	XP_010804480
İnek	κ-kazein	NP_776719
İnek	α-laktalbumin	NP_776803
İnek	β-laktoglobulin	NP_776354
İnek	Serum albümin	4F5S_B
Keçi	α_{s1}-kazein	NP_001272624
Keçi	α_{s2}-kazein	NP_001272514
Keçi	β-kazein	XP_005681778
Keçi	κ-kazein	NP_001272516
Keçi	α-laktalbumin	NP_001272564
Keçi	β-laktoglobulin	NP_001272468
Keçi	Serum albümin	XP_005681801

3.2.3.3. Biyoaktivitelerin belirlenmesi

Elde edilen peptid sekanslarının fonksiyonel özellikleri Giacometti ve Buretić-Tomljanović (2017) tarafından önerilen BIOPEP (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep), EROP-Moscow (http://erop.inbi.ras.ru/), PepBank (http://pepbank.mgh.harvard.edu/), PeptideDB (http://www.peptides.be/) ve Milk Bioactive Peptide Database (http://mbpdb.nws.oregonstate.edu/) online veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir.

Ayrıca, daha ayrıntılı inceleme yapmak amacıyla peptid sekansları Google Scholar (https://scholar.google.com.tr/) veri tabanında da taranmıştır.

3.2.4. İstatistiksel değerlendirmeler

Araştırma sonucunda elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur. Tüm veriler, üç tekerrürün ortalaması ± standart sapması olarak ifade edilmiştir. Farklı yörelere ait peynirlerin ve olgunlaştırma sürelerinin arasındaki önemli farklıkları belirlemek amacıyla %95 güven aralığında Tukey çoklu karşılaştırma testi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirilmeler MİNİTAB programı (versiyon 17) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Tulum Peyniri Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları ve Tartışma

4.1.1. pH değerlerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen pH değerleri Çizelge 4.1.'de sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen pH değerlerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca farklı yörelerden alınan tulum peyniri örneklerinin pH değerlerinde istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$). En yüksek pH değerleri olgunlaşma süresinin sonunda belirlenirken, en düşük pH değerleri ise olgunlaşma süresinin başlarında tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin olgunlaşma süresinin ilk ve son günlerindeki pH değerleri sırasıyla 4.95-5.07, 4.80-5.08, 4.79-5.12 ve 5.05-5.17 olarak belirlenmiştir. Genel olarak, olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinin 4.74 ve 5.17 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde, 90-180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Arslaner (2008) ve Sert (2011) tulum peynirlerinin pH değerlerini sırasıyla 5.07-5.17 ve 4.61-5.17 aralıklarında tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.1. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen pH değerleri (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$4.95\pm0.08^{A, a}$	$4.92\pm0.02^{A, a}$	$4.98\pm0.17^{A, a}$	$5.13\pm0.10^{A, a}$	$5.07\pm0.10^{A, a}$
Mut yöresi	$4.80\pm0.06^{A, c}$	$4.88\pm0.03^{A, bc}$	$4.94\pm0.03^{A, ab}$	$5.07\pm0.05^{A, a}$	$5.08\pm0.07^{A, a}$
Karaman yöresi	$4.79\pm0.06^{A, b}$	$4.74\pm0.07^{A, b}$	$4.85\pm0.09^{A, ab}$	$4.87\pm0.11^{A, ab}$	$5.12\pm0.16^{A, a}$
Ereğli yöresi	$5.05\pm0.30^{A, a}$	$4.83\pm0.13^{A, a}$	$4.92\pm0.19^{A, a}$	$5.06\pm0.15^{A, a}$	$5.17\pm0.14^{A, a}$

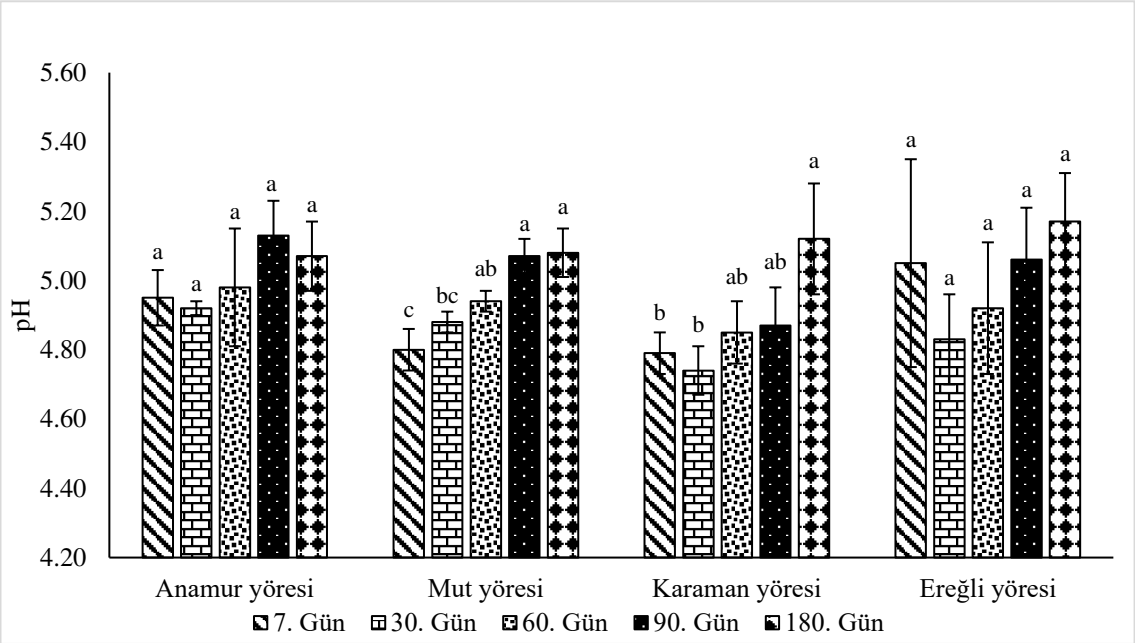
[A] Aynı sütunda aynı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkların bulunmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

[a-c] Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Genel olarak tüm tulum peynir örneklerinin pH değerleri olgunlaşma süresi boyunca nispi artış göstermiştir. Ancak, Anamur ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde, olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinde meydana gelen artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Bu yörelerde, titrasyon asitliğinde

belirlenen artışın peynirlerde asitliğin geliştiğini göstermesine rağmen, istatistiksel olarak pH değerlerinin bir değişim göstermemesi su aktivitesinin azalması ve kuru maddenin artması sonucu buffer kapasitesinin artmasından etkilenmiş olabilir. Bununla birlikte, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinde istatistiksel olarak artış saptanmıştır ($p<0.05$). Bu artışın, peynirlerde gerçekleşen proteoliz ile meydana gelen peptidlerin ve amino asitlerin tampon özellik göstermesinin yanı sıra meydana gelen amino asitlerin deaminasyonundan ve yağ asitlerinin metil ketonlara dönüşümünden kaynaklandığı düşünülmektedir (Alonso ve ark., 1987; McSweeney, 2004).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin pH değerlerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. İstatistiksel anlamda önemli fark bulunmamasına rağmen, olgunlaşma süresinin 30. gününde Anamur, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin pH değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Olgunlaşma sürecinin ilerleyen günlerinde, laktik asit bakterilerinin aktivitelerine bağlı olarak tulum peynirinde laktozun tamamen laktik aside dönüştürüldüğü ve asetik, formik, propiyonik, sitrik, süksinik asitler gibi diğer organik asitlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Tekin ve Güler, 2019). Dolayısıyla, olgunlaşma süresinin 30. gününde gözlemlenen bu azalma, laktik asit bakterilerinin aktivitelerini desteklemektedir.



Şekil 4.1. Olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresinin 30. gününü takiben, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinin pH değerleri olgunlaşma süresi boyunca düzenli bir şekilde istatiksel olarak artış göstermiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresince gözlemlenen bu artış, Atasoy ve Türkoğlu (2009)'nun çalışması ile zıt bir seyir izlemiştir. İlgili araştırmacılar, 90 günlük olgunlaşma süresi sonunda Urfa peynirlerinin pH değerlerinin azaldığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Arslaner (2008) ve Öztürkoğlu (2014) 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinde bu çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde artan bir pH trendi gözlemlemişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinde gözlemlenen bu farklılıkların kullanılan sütün bileşimindeki farklılıklardan ve peynir üretim metodundaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Olgunlaşma süresince peynirlerin pH değerlerinde meydana gelen artışın; mevcut mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak üretilen asitlerin ortamdaki mayalar ve küfler tarafından kullanılmasından (Schlesser ve ark., 1992), olgunlaşmanın ilerleyen günlerinde gerçekleşen proteoliz ile meydana gelen peptid ve amino asitlerin amfoter özelliklerinden, amino asitlerin deaminasyonundan ve yağ asitlerinin oksidasyonu veya dekarboksilasyonu sonucu oluşan metil ketonlardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Alonso ve ark., 1987; McSweeney, 2004).

4.1.2. Titrasyon asitliği değerlerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen titrasyon asitliği değerleri Çizelge 4.2.'de gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen titrasyon asitliği değerlerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 7. gününde en yüksek titrasyon asitliği değerleri Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peyniri örneklerinde belirlenirken, en düşük titrasyon asitliği değeri ise Anamur ve Mut yörelerine ait peynir örneklerinde tespit edilmiştir. Ancak, olgunlaşma süresinin 7. günündeki bu farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Çizelge 4.2.'den de görüldüğü gibi, olgunlaşma süresinin başlangıcına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda titrasyon asitliği değerlerindeki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin 7. gününe kıyasla 180. günde meydana gelen bu artışların Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirleri için sırasıyla 1.09, 0.68, 0.43 ve 0.59 birim olduğu saptanmıştır. En fazla artışın Anamur yöresine ait peynirlerde olduğu ve titrasyon asitliğinin olgunlaşma süresinin sonunda %58.29 arttığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen titrasyon asitliği değerleri (% laktik asit) (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	1.87±0.59$^{A, b}$	2.21±0.01$^{B, b}$	2.42±0.09$^{A, ab}$	2.35±0.04$^{B, ab}$	2.96±0.06$^{A, a}$
Mut yöresi	2.28±0.03$^{A, c}$	2.23±0.02$^{B, c}$	2.43±0.01$^{A, b}$	2.38±0.02$^{B, b}$	2.96±0.04$^{A, a}$
Karaman yöresi	2.50±0.02$^{A, b}$	2.43±0.03$^{A, b}$	2.37±0.05$^{A, b}$	3.08±0.07$^{A, a}$	2.93±0.09$^{A, a}$
Ereğli yöresi	2.32±0.25$^{A, c}$	2.34±0.14$^{AB, c}$	2.38±0.04$^{A, c}$	2.78±0.40$^{AB, b}$	2.91±0.08$^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

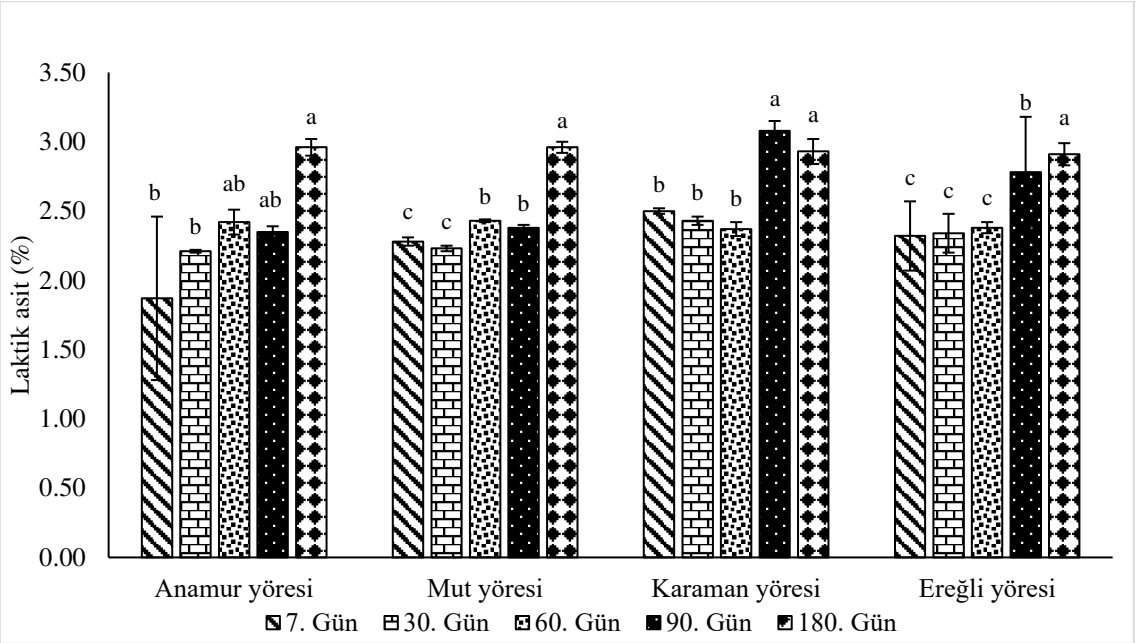
Peynirlerin olgunlaşma sürecinde çeşitli mikrobiyolojik, biyokimyasal ve metabolik süreçler rol oynamaktadır (Farkye, 2004). Olgunlaşma sürecinin ilk aşamalarında laktoz hızlı bir şekilde laktik aside dönüşmektedir ve meydana gelen laktik asit oksidasyonun, rasemizasyonun veya mikrobiyal faaliyetlerin önemli bir öncül maddesi olarak peynirde asitliğin gelişmesine neden olmaktadır (McSweeney, 2004; Ong ve ark., 2007). Bu çalışmada olgunlaşma süresinin sonunda saptanan titrasyon asitliği artışının 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak gerçekleşen glikoliz, proteoliz ve lipoliz gibi biyokimyasal süreçlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Titrasyon asitliğinde gözlemlenen artışların, olgunlaşma süresinin 30. ve 90. günlerinde yörelere göre farklılık gösterdiği belirlenirken ($p<0.05$), olgunlaşma süresinin 7., 60. ve 180. günlerindeki titrasyon asitliği değerlerinin ise tüm yörelere ait tulum peynirlerinde benzer olduğu ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin 30. gününde en yüksek titrasyon asitliği değeri Karaman yöresine ait Tulum peynirlerinde belirlenmiştir, bunu sırasıyla Ereğli yöresine ait tulum peynirleri ve benzer titrasyon asitliği değerleri ile Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Aynı şekilde, olgunlaşma süresinin 90. gününde de benzer bir titrasyon asitliği trendi gözlemlenmiştir. Demirci (2019) Karaman, Ereğli, Mut ve Anamur yörelerinde üretilen tulum peynirlerinin mikrobiyal dinamiğini incelediği çalışmada 180 günlük depolama süresinin sonunda Karaman ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde *Enterococcus* ve *Lactobacillus* türlerinin, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde ise *Enterococcus* türlerinin ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinde ise *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinin baskın hale geldiğini bildirmiştir. Dolayısıyla, yörelere göre değişen bu mikrobiyal dinamik göz önünde bulundurulduğunda, tulum peynirlerinde bulunan mikrobiyotanın ve dolayısıyla enzimlerin değişikliği veya çeşitliliği titrasyon

asitliği değerlerinde yöresel olarak tespit edilen bu farklılıklara neden olmuş olabilir. Tulum peynirindeki mikrobiyota üretimde kullanılan çiğ sütün özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Sert (2011) çiğ inek, keçi ve koyun sütleri kullanılarak üretilen tulum peynirlerinde olgunlaşma süresince en yüksek titrasyon asitliği değerlerini koyun sütünden üretilen tulum peynirlerinde belirlemiştir ve bunu sırasıyla inek ve keçi sütlerinden üretilen peynirler takip etmiştir. Benzer şekilde, Öztürk (2015) 120 günlük olgunlaşma süresi boyunca çiğ inek sütünden üretilen tulum peynirlerinin titrasyon asitliği değerlerini çiğ keçi sütünden üretilen tulum peynirlerinden daha yüksek bulmuştur.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerine ait titrasyon asitliği değerleri olgunlaşma süresinin başında %1.87-2.50 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise bu değerler %2.91-2.96 arasında tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına en yakın titrasyon asitliği değerleri, Gün (2012) tarafından farklı ambalaj materyalleri ile 120 gün olgunlaştırılan tulum peynirlerinde belirlenmiş olup titrasyon asitliği değerlerinin 1.73 ve 2.31% arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan, bu çalışmada elde edilen titrasyon asitliği değerleri Arslaner (2008) tarafından Erzincan tulum peynirlerinde (%0.88-1.29) ve Sert (2011) tarafından koyun, keçi ve inek sütlerinden üretilen tulum peynirlerinde (%1.09-1.78) belirlenen titrasyon asitliği değerlerinden yüksek bulunmuştur.

Anamur yöresine ait tulum peynirinde olgunlaşma süresinin 30. ve 90. günlerini takiben titrasyon asitliğinde artış gözlemlenmiş olup en yüksek titrasyon asit 180. günde belirlenmiştir ($p<0.05$). Titrasyon asitliğinde benzer değişim Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 90. gününde titrasyon asitliğinde artış belirlenmiştir ($p<0.05$) ve olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde belirlenen titrasyon asitliği değerlerin istatistiksel açıdan benzer olduğu saptanmıştır ($p>0.05$). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ise en yüksek titrasyon asitliği olgunlaşma süresinin 180. gününde belirlenmiş olup, olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinden sonra titrasyon asitliği değerlerindeki artışların istatiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.2. Olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca, tulum peyniri örneklerinde titrasyon asitliğinin ilerlemesi beklenen bir durumdur. Benzer sonuçlar, Arslaner (2008) tarafından analiz edilen Erzincan tulum peynirlerinde ve Gün (2012) tarafından farklı oksijen geçirgenliğine sahip kılıflarda olgunlaştırılan tulum peynirlerinde bildirilmiştir. Farklı yörelere ait tulum peynirlerinde titrasyon asitliğinin farklı olgunlaşma günlerinde artış göstermesi üretimde kullanılan sütün bileşimindeki farklılıklardan, olgunlaşma süresine bağlı olarak mikrobiyal yükün değişiminden ve mevcut enzim aktivitelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.3. Kuru madde içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen titrasyon asitliği değerleri Çizelge 4.3.'te gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen kuru madde içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilk günlerinde, tulum peyniri örneklerinin kuru madde içeriklerinin yörelere göre değiştiği tespit edilmiştir ve en yüksek kuru madde içeriği Karaman ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Çizelge 4.3.'ten de anlaşıldığı gibi, olgunlaşma süresinin başlangıcına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda

kuru madde içeriklerindeki değişimin istatistiksel olarak tüm yörelere ait tulum peynirlerinde önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin sonunda tulum peyniri örneklerinin kuru madde içeriklerinde yaklaşık %20 ve 30 arasında artış saptanmıştır. En fazla kuru madde içeriği artışının olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinden sonra meydana geldiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen kuru madde içerikleri (%) (n=3)

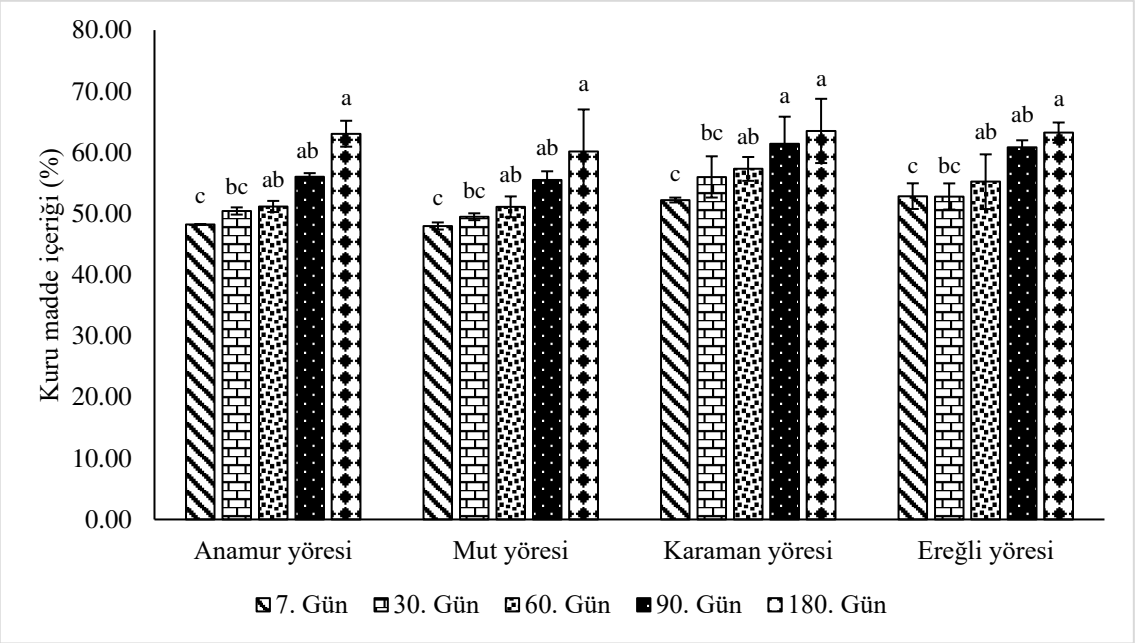
Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$48.22\pm0.06^{B, d}$	$50.43\pm0.59^{B, cd}$	$51.17\pm0.91^{A, c}$	$56.04\pm0.58^{A, b}$	$63.06\pm2.12^{A, a}$
Mut yöresi	$47.98\pm0.58^{B, b}$	$49.49\pm0.56^{B, b}$	$51.11\pm1.70^{A, b}$	$55.51\pm1.41^{A, ab}$	$60.16\pm6.87^{A, a}$
Karaman yöresi	$52.22\pm0.40^{A, b}$	$56.00\pm3.37^{A, ab}$	$57.31\pm1.95^{A, ab}$	$61.41\pm4.44^{A, ab}$	$63.52\pm5.25^{A, a}$
Ereğli yöresi	$52.86\pm2.10^{A, c}$	$52.80\pm2.14^{AB, c}$	$55.22\pm4.47^{A, bc}$	$60.83\pm1.16^{A, ab}$	$63.24\pm1.66^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-d}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresinin başında tulum peyniri örneklerinin kuru madde içeriklerinin %47.98 ve 52.96 arasında olduğu ve olgunlaşma süresinin sonunda ise kuru madde içeriklerinin %60.16 ve 63.52 arasındaki değerlere ulaştığı tespit edilmiştir. TS (1995) tüketime sunulan tulum peynirlerin kuru madde içeriklerinin en az %60 olması gerektiğini bildirmiştir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmada olgunlaşma süresinin sonunda elde edilen kuru madde içeriklerinin TS 3001 Tulum Peyniri Standardı'na uygun olduğu belirlenmiştir. Farklı ambalaj malzemesi, farklı sütler ve farklı üretim metotları kullanılarak üretilen tulum peynirlerinin genel bileşimlerini inceleyen araştırmacılardan Arslaner (2008) Erzincan tulum peynirinde toplam kuru madde içeriğini %55.42-62.56 arasında, Sert (2011) koyun ve keçi sütleri (50:50) kullanılarak üretilen tulum peynirlerinde toplam kuru madde içeriğini %46.74-64.58 arasında ve Gün (2012) deriye basılan tulum peynirlerinde toplam kuru madde içeriğini %56.47-68.75 arasında belirlemişlerdir. Bu sonuçlar, bu araştırmada elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Olgunlaşma süresinin 7. ve 30. günü en düşük kuru madde içeriği Anamur ve Mut yörelerinde üretilen tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Yöresel olarak gözlemlenen bu farklılığın tulum peyniri üretiminde kullanılan sütün türüne ve kompozisyonuna ve üretim esnasında baskıda kalma süresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerde tulum peyniri

örneklerinin kuru madde içeriklerindeki değişimin yörelere göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir (p>0.05).



Şekil 4.3. Olgunlaşma süresi boyunca kuru madde içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir (p<0.05).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin kuru madde içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak kuru madde içeriklerindeki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlenmiştir (p<0.05). Mut yöresine ait tulum peynirlerinde ise kuru madde içeriği olgunlaşma süresinin 60. gününden sonra kademeli olarak artış göstermiştir (p<0.05). Diğer taraftan, Karaman yöresi tulum peynirlerinin kuru madde içeriği olgunlaşma süresinin 7. gününden itibaren kısmi bir artış göstermiş olup, en yüksek artış olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra meydana gelmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ise kuru madde içeriği olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra kademeli olarak artmıştır (p<0.05).

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, Arslaner (2008), Bayar (2008) ve Sert (2011) olgunlaşma süresi sonunda tulum peynirlerinde kuru madde oranının artığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, olgunlaştırılarak tüketime sunulan yüzeyi olgunlaştırılmış Muenster tipi bir Fransız peynirinde de olgunlaşma süresi boyunca nem kaybına bağlı olarak kuru madde oranının arttığı bildirilmiştir (Riahi ve ark., 2007). İlerleyen olgunlaşma günlerinde gözlemlenen kuru madde artışı, olgunlaşma süresine bağlı olarak artan

titrasyon asitliği değerlerinin su tutma kapasitesini azaltması sonucu tulum peynirlerinden su kaybının meydana gelmesiyle açıklanabilir (Pastorino ve ark., 2003). Ayrıca, olgunlaşma esnasındaki depolama koşulları ve olgunlaştırmada peynirin muhafaza edildiği ambalaj materyali de kuru madde içeriğinde gözlemlenen artış üzerinde etkili olmuş olabilir.

4.1.4. Yağ içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen yağ içerikleri Çizelge 4.4.'te sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen yağ içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Tulum peyniri örneklerinin kuru madde artışına paralel olarak yağ içeriklerinin de olgunlaşma süresince arttığı tespit edilmiştir. Ancak, bu artışların yalnızca Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde istatiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresince kuru madde içeriğinde en yüksek artışın (%25-30) belirlendiği Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde yağ içeriğinin de en yüksek düzeyde (%16-25) arttığı tespit edilirken, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin olgunlaşma süresince yağ içeriğindeki artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Yağ içeriğinde gözlemlenen artışların su kaybına bağlı olarak meydana gelen oransal artışlar olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen yağ içerikleri (%) (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$21.36\pm0.08^{B, c}$	$22.46\pm0.40^{A, c}$	$22.65\pm0.32^{A, c}$	$24.31\pm0.15^{A, b}$	$26.71\pm1.10^{A, a}$
Mut yöresi	$21.70\pm0.54^{B, b}$	$22.28\pm0.29^{A, b}$	$22.88\pm0.59^{A, ab}$	$24.46\pm0.27^{A, ab}$	$26.11\pm2.61^{A, a}$
Karaman yöresi	$24.77\pm0.40^{A, a}$	$26.49\pm2.71^{A, a}$	$25.84\pm2.46^{A, a}$	$28.74\pm3.19^{A, a}$	$27.34\pm4.66^{A, a}$
Ereğli yöresi	$22.83\pm1.98^{AB, a}$	$23.23\pm2.68^{A, a}$	$23.53\pm3.94^{A, a}$	$26.38\pm3.14^{A, a}$	$26.14\pm2.39^{A, a}$

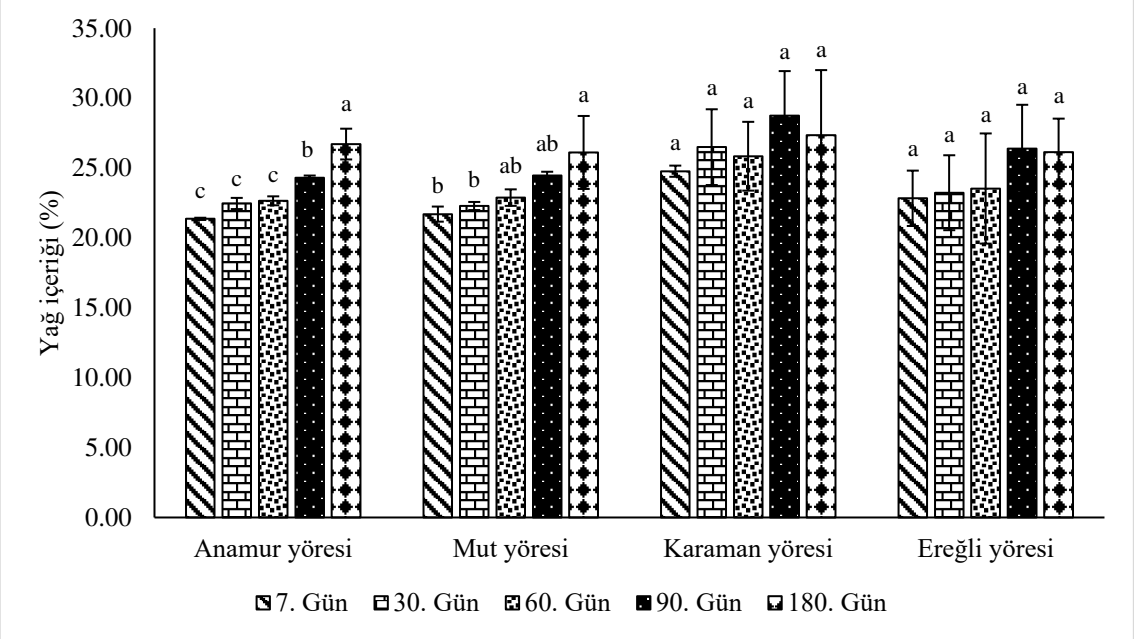
$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-ac}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresinin 7. gününde en yüksek yağ içeriği %24.77 ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir, bunu sırasıyla Ereğli yöresine ait tulum peynirleri ve benzer yağ oranları ile Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirleri takip

etmiştir ($p<0.05$). Yöresel olarak gözlemlenen bu farklılıklar, üretimde kullanılan sütün türünden ve bileşimden ve işleme koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Sert (2011) farklı süt türleri kullanılarak üretilen tulum peynirlerinde en yüksek yağ içeriğini (%27.65) koyun sütünden üretilen tulum peynirlerinde belirlerken, en düşük yağ içeriğini (%22.43) ise inek sütünden üretilen tulum peynirlerinde gözlemlemiştir. Ayrıca, aynı araştırmacı ısıl işlem uygulanan sütlerden üretilen tulum peynirlerinin yağ içeriğinin çiğ sütten üretilenlere kıyasla yaklaşık %1.77 oranında fazla olduğunu bildirmiştir.

Olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde ise tulum peyniri örneklerinin yağ içeriklerinde yöresel olarak bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Olgunlaşma süresi boyunca, tulum peyniri örneklerinin yağ içeriklerinin %21.36 ve 28.74 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada elden edilen sonuçlar, Göncü ve ark. (2004), Arslaner (2008) ve Gün (2012) tarafından tulum peynirlerinde belirlenen yağ oranları ile uygunluk göstermektedir. Buna karşılık, olgunlaşma süresince gözlemlenen yağ içerikleri Öztürkoğlu (2014) tarafından 120 günlük olgunlaşma süresi boyunca Divle tulum peynirlerinde tespit edilen değerlerden yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.4. Olgunlaşma süresi boyunca yağ içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin yağ içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin yağ içeriğinin olgunlaşma süresinin 60. günden sonra kademeli olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir ve en yüksek yağ içeriği olgunlaşma süresinin sonunda %26.71 olarak belirlenmiştir ($p<0.01$). Mut yöresinde ise olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra tulum peynirlerinin yağ içeriğinde nispi bir artış gözlenmiş olup, en yüksek yağ içeriği %26.11 ile olgunlaşma süresinin 180. gününde tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bunlarla birlikte, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca artan yağ içeriğinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Genel olarak olgunlaşma süresi boyunca yağ içerikleri yaklaşık %14 ve 25 arasında artış göstermiştir. Olgunlaşma süresinin 360 gün olarak belirlendiği bir çalışmada Sert (2011) tarafından da tulum peynirlerinde benzer yağ içeriği artışları gözlenmiştir. Olgunlaşma süresince nem kaybından dolayı artan kuru madde oranına bağlı olarak tulum peynirlerinde yağ içeriğinin arttığı birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Arslaner, 2008; Demirci, 2019). Gün (2012), nem geçirgenliğinin en yüksek olduğu tulum, doğal bağırsak ve bez torba kullanılarak olgunlaştırılan tulum peynirlerinin olgunlaşma sırasında yağ içeriğinin de yüksek olduğunu belirtmiştir.

4.1.5. Tuz içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen tuz oranları Çizelge 4.5.'te gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen tuz içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Beklenildiği gibi tüm tulum peyniri örneklerinin tuz içerikleri kuru madde artışına paralel olarak 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda yaklaşık %0.12-0.43 oranında artış göstermiştir. Olgunlaşma süresince en yüksek tuz içeriği artışı %0.43 ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, olgunlaştırma süresinin başında ve sonunda en yüksek tuz içeriğine de sırasıyla %2.29 ve %2.64 oranlarıyla Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen tuz içerikleri (%) (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$2.11\pm0.28^{A, a}$	$2.20\pm0.18^{A, a}$	$2.05\pm0.17^{A, a}$	$2.35\pm0.17^{A, a}$	$2.47\pm0.22^{A, a}$
Mut yöresi	$2.15\pm0.19^{A, a}$	$2.24\pm0.10^{A, a}$	$2.10\pm0.11^{A, a}$	$2.32\pm0.07^{A, a}$	$2.27\pm0.08^{A, a}$
Karaman yöresi	$2.29\pm0.09^{A, b}$	$2.38\pm0.13^{A, ab}$	$2.41\pm0.13^{A, ab}$	$2.40\pm0.16^{A, ab}$	$2.64\pm0.07^{A, a}$
Ereğli yöresi	$2.09\pm0.10^{A, a}$	$2.26\pm0.08^{A, a}$	$2.27\pm0.26^{A, a}$	$2.46\pm0.40^{A, a}$	$2.52\pm0.20^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

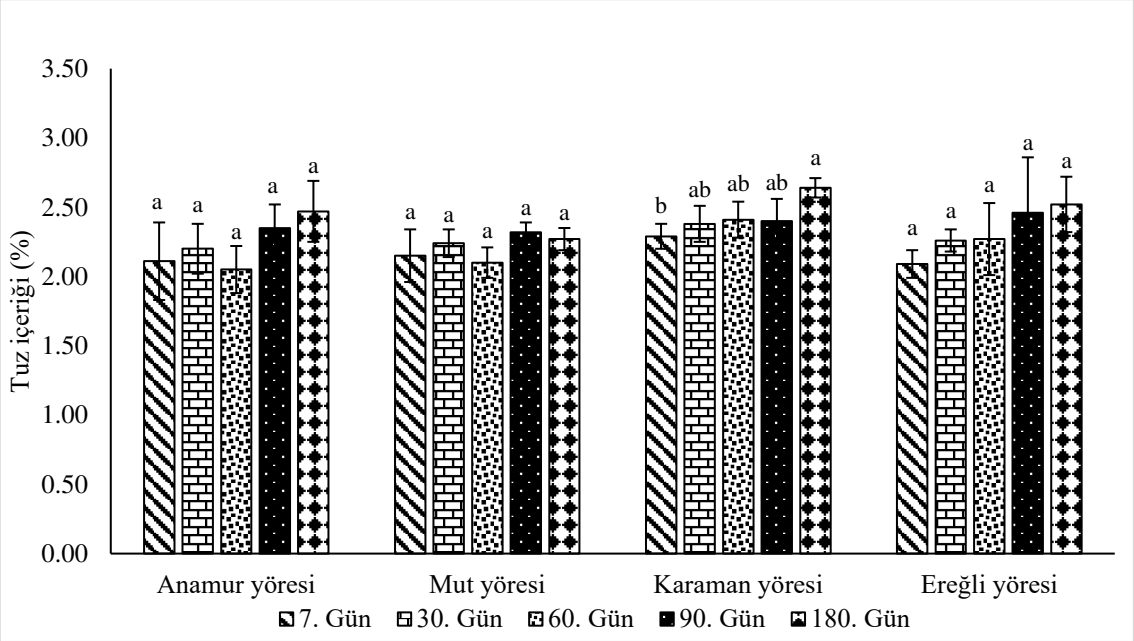
$^{a-b}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin tuz içeriklerinin yörelere göre istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği saptanmıştır ($p>0.05$). Genel olarak olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinin tuz içerikleri %2.09 ve %2.64 arasında belirlenmiştir. Erzincan tulum peynirlerinin tuz içeriklerini inceleyen Arslaner (2008) 90 günlük olgunlaşma süresinin başında tuz içeriğini %3.60-4.17 arasında ve olgunlaşma süresinin sonunda ise %4.24-6.20 arasında olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, Bayar (2008) olgunlaşma süresinin başlarında deri tulum peynirlerinin tuz içeriğini %3.18 olarak belirlerken, olgunlaşma süresinin sonunda tuz içeriğinin %4.54'e ulaştığını bildirmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen değerler, bu araştırmada tespit edilen tuz içeriklerinden oldukça yüksektir. Bununla birlikte, bu çalışmada elde edilen tuz içerikleri Öztürkoğlu (2014) tarafından Divle obruk peynirinde (%3.06-3.68), Çakır ve Çakmakçı (2018) tarafından Erzincan tulum peynirinde (%2.64-3.27) ve Demirci (2019) tarafından Orta Toroslar yöresinde üretilen tulum peynirlerinde (%2.05-2.56) belirlenen tuz içeriklerine benzerlik göstermektedir. Tuz içeriğinde tespit edilen farklılıkların üretimde kullanılan tuzun türüne ve miktarına, üretim metoduna, olgunlaştırma şartlarına ve olgunlaşma süresince meydana gelen nem kaybına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülebilir.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin tuz içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin tuz içeriklerindeki değişim olgunlaşma süresince istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Benzer şekilde, Cichoscki ve ark. (2002) ve Öztürkoğlu (2014) 60 günlük olgunlaşma süresi boyunca peynirlerde tuz içeriği değişiminin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin tuz içeriği olgunlaşma süreci boyunca sürekli artış gösterirken, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde tuz içeriklerinin olgunlaşma süreci boyunca dalgalı seyir izlediği tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresince tuz içeriklerinde

benzer bir dalgalı seyir Karaca (2007) tarafından 90 gün boyunca olgunlaştırılan beyaz peynirlerde de gözlemlenmiştir. Bu durumun, tuzun homojen bir şekilde karıştırılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle tulum peyniri gibi kuru tuzlama yapılarak üretilen peynirlerde, tuz içeriği bakımından deri içindeki peynir kitlesinde bölgesel farklılıklar meydana gelebilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma sırasında tuz içeriklerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve genel olarak olgunlaşma süresince tuz oranında artan bir trend gözlemlenmiştir. İlgili yöreye ait tulum peynirlerinin tuz içerikleri olgunlaşma süresinin 30. gününde nispi bir artış göstermiş olup ($p<0.05$) olgunlaşma süresinin 30., 60. ve 90. günlerindeki tuz içeriklerinin değişmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra tuz içeriğinin arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresince tulum peyniri örneklerinin tuz miktarlarında meydana gelen artış Arslaner (2008), Sert (2011) ve Gün (2012) tarafından da bildirilmiştir. Olgunlaşma süresince tuz içeriğinde gözlemlenen artışların, olgunlaştırma şartlarına bağlı olarak meydana gelen su kaybından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca, olgunlaşma süresince tulum peynirlerinin tuz içeriğinde yörelere göre değişen bir trend görülmesi pH, nem içeriği ve yüzey alanı gibi tuzun difüzyonunu etkileyen faktörlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir (Guinee, 2004).



Şekil 4.5. Olgunlaşma süresi boyunca tuz içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-b] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

4.1.6. Kül içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen kül içerikleri Çizelge 4.6.'da sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen kül içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında en yüksek kül içeriği %4.72 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde ve en düşük kül içeriği %3.79 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise en yüksek kül içeriği %5.56 ile Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde ve en düşük kül içeriği %5.25 ile Mut yöresinde üretilen tulum peynirlerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen kül içerikleri (%) (n=3)

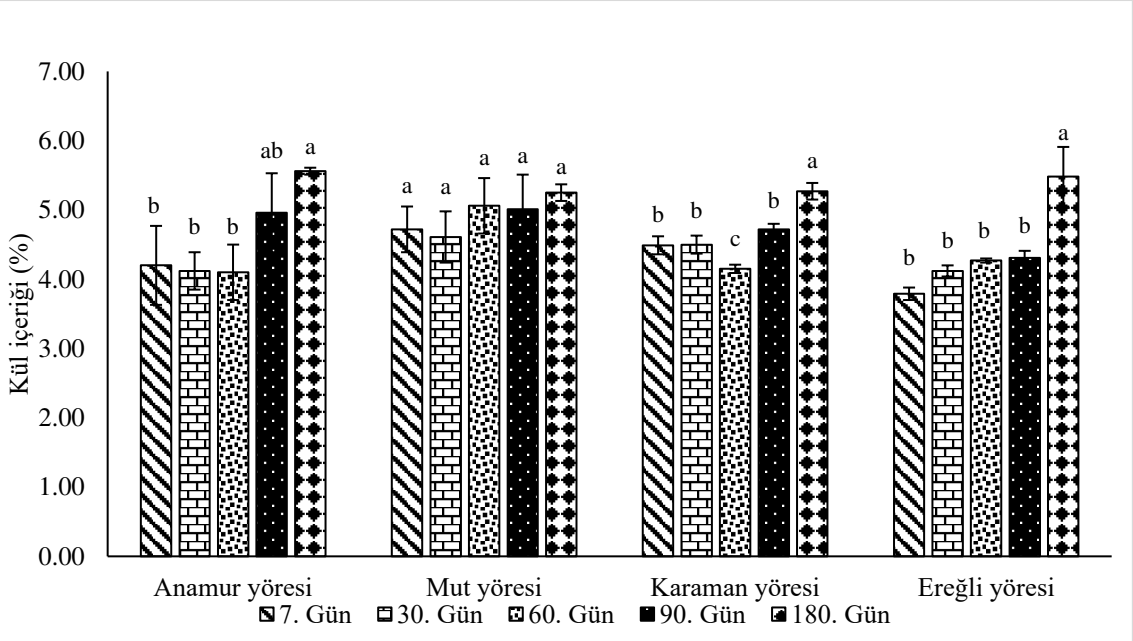
Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$4.20\pm0.57^{AB, b}$	$4.12\pm0.27^{A, b}$	$4.10\pm0.40^{B, b}$	$4.96\pm0.57^{A, ab}$	$5.56\pm0.05^{A, a}$
Mut yöresi	$4.72\pm0.33^{A, a}$	$4.61\pm0.37^{A, a}$	$5.06\pm0.40^{A, a}$	$5.01\pm0.50^{A, a}$	$5.25\pm0.12^{A, a}$
Karaman yöresi	$4.49\pm0.13^{AB, b}$	$4.50\pm0.13^{A, b}$	$4.15\pm0.06^{B, c}$	$4.72\pm0.08^{A, b}$	$5.27\pm0.12^{A, a}$
Ereğli yöresi	$3.79\pm0.09^{B, b}$	$4.12\pm0.08^{A, b}$	$4.27\pm0.03^{B, b}$	$4.31\pm0.10^{A, b}$	$5.48\pm0.43^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Genel olarak olgunlaşma sürecinin başında tulum peyniri örneklerinde %3.79-4.72 arasında kül içeriği belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise kül içerikleri %5.25-5.56 arasında tespit edilmiştir. Mineral ve tuzun göstergesi olarak yapılan kül içeriği analizinde, bu çalışmada elde edilen kül içerikleri Gün (2012) tarafından belirlenen değerlerden yüksek bulunurken, Arslaner (2008) tarafından Erzincan tulum peynirlerinde tespit edilen değerlerle benzer bulunmuştur. Bu farklılıklar kullanılan değişik ambalaj materyallerinden dolayı gözlemlenen farklı nem geçirgenliğinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü, Gün (2012) çalışmasında oksijen geçirgenliği düşük ambalaj malzemesi kullanmıştır. Bununla birlikte, bu çalışmada elde edilen kül içerikleri Sert (2011) tarafından yarı yarıya koyun ve keçi sütleri kullanılarak üretilen tulum peynirlerinde belirlenen kül oranlarından düşük bulunmuştur.

Olgunlaşma süresinin 7. günü örneklerin kül içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve en yüksek kül içeriği Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup ($p<0.5$) bunu sırasıyla benzer kül içerikleri ile Anamur ve Karaman

yöresine ait tulum peynirleri ve Ereğli yöresine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Ancak olgunlaşma süresinin 30. gününde belirlenen kül içeriklerinin yörelere değişiminin önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin 60. gününde Mut yöresine ait tulum peynirlerin kül içeriğinin diğer yörelere ait tulum peynirlerinin kül içeriğinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin 60. gününü takiben ilerleyen olgunlaşma günlerinde ise örneklerin kül içeriklerinin yörelere göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Genel olarak tulum peyniri örneklerinin tuz içeriğinin de olgunlaşma süresince yörelere göre farklılık göstermemesi bu sonuçları desteklemektedir. Ayrıca, olgunlaşma süresinin 7. ve 30. günlerinde yörelere özgü olarak gözlemlenen farklılıklar üretimde kullanılan sütlerin kompozisyonun farklı olmasından, üretimde farklı tuz türünün ve miktarlarının tercih edilmesinden ve uygulanan üretim metotlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Ceballos ve ark. (2009) inek sütünün kül içeriğinin keçi sütünden daha düşük olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla, üretimde farklı türdeki sütlerin kullanılması da peynir örneklerindeki kül içeriğini etkileyecektir. Bununla birlikte, peynir örneklerinin değişken asitlik değerlerine sahip olması peynir kitlesine farklı oranlarda tuzun geçişine neden olmaktadır (Guinee, 2004).



Şekil 4.6. Olgunlaşma süresi boyunca kül içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-b] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin kül içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 30. gününe kadar kül içeriklerinde istatistiksel olarak bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak, ilerleyen olgunlaşma günlerinde kül içeriklerinin istatistiksel olarak arttığı tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde ise olgunlaşma süresince kül içeriklerinin istatistiksel olarak farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0.05$). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 30. gününde kül içeriğinde azalış saptanırken, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde kül içeriğinde düzenli bir artış gözlenmiştir. Ereğli yöresinde ise olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar tulum peynirlerinde belirlenen kül içeriklerinin istatistiksel olarak benzer olduğu ($p>0.05$), ancak olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra kül içeriğinin arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Genel olarak tüm tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin sonunda kül içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Gözlemlenen bu artışın olgunlaşma süresince nem kayıplarına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Ayrıca, olgunlaşma süresince tüm tulum peyniri örneklerinin asitlik değerlerinde meydana gelen artış göz önünde bulundurulduğunda, olgunlaşma süresinin sonunda kül içeriklerinde gözlemlenen artış olgunlaşma sırasında yükselen asitlik değerlerinin tuz emilimini artırmasından kaynaklanmış olabilir (Guinee, 2004). Tulum peynirlerinin olgunlaşma süresince kül içeriğinin arttığı Arslaner (2008) ve Sert (2011) tarafından da gözlemlenmiştir.

4.1.7. Su aktivitesi (a_w) değerlerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen su aktivitesi (a_w) değerleri Çizelge 4.7.'de gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen a_w değerlerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Tulum peyniri örneklerin a_w değerleri olgunlaşma süresinin başında 0.938-0.950 arasında belirlenmiştir. Örneklerin a_w değerlerinin olgunlaşma süresine paralel olarak düzenli bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir. En fazla azalış, olgunlaştırma süresinin başına kıyasla 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda tulum peynirlerinin a_w değerleri 0.053-0.060 birim azalmıştır ve en fazla azalış kuru madde oranının en yüksek olduğu Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen su aktivitesi (a_w) değerleri (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$0.950\pm0.005^{A, a}$	$0.948\pm0.002^{A, a}$	$0.930\pm0.003^{A, b}$	$0.921\pm0.007^{A, b}$	$0.897\pm0.002^{A, c}$
Mut yöresi	$0.942\pm0.003^{A, a}$	$0.940\pm0.001^{B, a}$	$0.934\pm0.004^{A, ab}$	$0.924\pm0.008^{A, b}$	$0.888\pm0.004^{A, c}$
Karaman yöresi	$0.947\pm0.003^{A, a}$	$0.921\pm0.004^{C, b}$	$0.915\pm0.006^{B, b}$	$0.910\pm0.006^{A, bc}$	$0.887\pm0.018^{A, c}$
Ereğli yöresi	$0.938\pm0.009^{A, a}$	$0.923\pm0.001^{C, b}$	$0.918\pm0.004^{B, bc}$	$0.909\pm0.004^{A, c}$	$0.885\pm0.001^{A, d}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

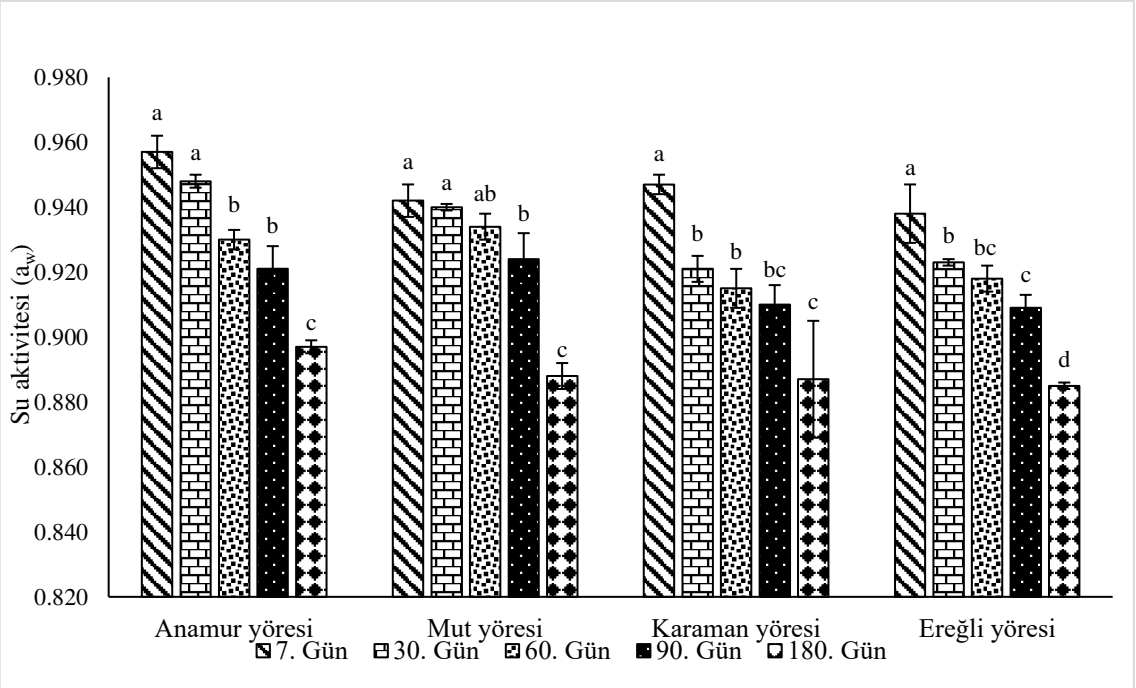
Genel olarak, olgunlaşma süresinin 7. günü a_w değerleri 0.938-0.950 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin 180. gününde ise 0.885-0.897 arasında tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Morul (2011) Karaman ve Ereğli yörelerinde ticari olarak satışa sunulan Divle tulum peynirlerinin a_w değerlerini 0.870-0.980 arasında belirlemiştir. Ayrıca, Sert (2011) inek sütünden üretilen tulum peynirlerinin a_w değerini 0.942 ve koyun sütünden üretilen tulum peynirlerinin a_w değerini 0.920 olarak tespit etmiştir. Bu araştırmacı bununla birlikte ısıl işlem uygulanarak üretilen tulum peynirlerinin daha düşük a_w değerlerine sahip olduğunu bildirmiştir.

Olgunlaşma süresinin ilk günü tulum peynirlerinde belirlenen a_w değerlerinin yörelere göre farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Ancak, olgunlaşma süresinin 30. gününde a_w değerlerinde yörelere göre farklılık belirlenmiş olup, en yüksek a_w değeri Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$) ve bunu sırasıyla Mut yöresine ait tulum peynirleri ve benzer a_w değerleriyle Karaman ve Ereğli yöresine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Olgunlaşma süresinin 60. gününde ise Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinde a_w değerlerinin Karaman ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Bu farklılıkların örneklerin nem içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, Saurel ve ark. (2004) tuz konsantrasyonunun peynirlerde a_w değerini azalttığını bildirmişlerdir. İlerleyen olgunlaşma günlerinde ise tulum peyniri örneklerinin a_w değerlerinde yöresel olarak farklılık gözlenmemesi ($p>0.05$) ilgili olgunlaşma günlerindeki benzer kuru madde ve tuz oranlarına sahip olmalarıyla paralellik göstermektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin a_w değerlerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde a_w değerinin olgunlaşma süresinin 30. ve 90. gününden sonra önemli

derecede azaldığı ($p<0.05$) ve en düşük a_w değerinin olgunlaşma süresinin 180. gününde ($p<0.05$) olduğu gözlemlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin a_w değeri ise olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra kısmi bir azalış göstermiş, ancak ilerleyen olgunlaşma günlerine paralel olarak a_w değeri de önemli derecede azalmıştır ($p<0.05$). Bunula birlikte, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde a_w değerleri olgunlaşma süresinin 7. gününden sonra önemli düzeyde azalış göstermiş olup, peynirlerinde a_w değerlerinde en yüksek azalış olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra belirlenmiştir ($p<0.05$). Sert (2011) ve Öztürk (2015) tarafından da olgunlaşma süresinin sonunda tulum peynirlerinin a_w değerlerinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir.

Su aktivitesinin, olgunlaşma süresince meydana gelen biyokimyasal değişimlerden etkilenen önemli bir fizikokimyasal parametre olduğu öne sürülmektedir (Sousa ve ark., 2001). Olgunlaşma süresi boyunca peynirde gerçekleşen proteoliz ile peptid bağlarının hidrolize olması sonucunda açığa çıkan iyonize olmuş karboksilik asit ve amino gruplarının su bağlama kapasitesinde artışa neden olduğu ve su moleküllerinin bağlanmasıyla su aktivitesinde meydana gelen azalma ile peynir yapısının gelişmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017).



Şekil 4.7. Olgunlaşma süresi boyunca su aktivitesi değerlerinde gözlemlenen değişim. [a-d] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Bu çalışmadan elde edilen SDS-PAGE analizi sonuçları göz önünde bulundurulduğunda olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak kazein matriksinde (özellikle α_s- ve β- kazein) de hidrolizinin arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde a_w değerlerinin diğer yörelere kıyasla daha fazla azalış göstermesi olgunlaşma süresinin 7. gününü takiben bu yörelerde gözlenen yoğun α_s-kazein hidrolizinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunlara ilaveten, olgunlaşma sırasında artan nem kaybına ve tuz konsantrasyonuna da bağlı olarak a_w değerlerinin azaldığı öngörülmektedir.

4.1.8. Protein içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen protein içerikleri Çizelge 4.8.'de gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen protein içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Taze tulum peyniri örneklerinde en yüksek protein içeriği (%24.58) Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, en düşük protein içeriği (%22.59) Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise en yüksek protein içeriği (%30.7) Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, en düşük protein içeriği ise (%27.58) Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen protein içerikleri (%) (n=3)

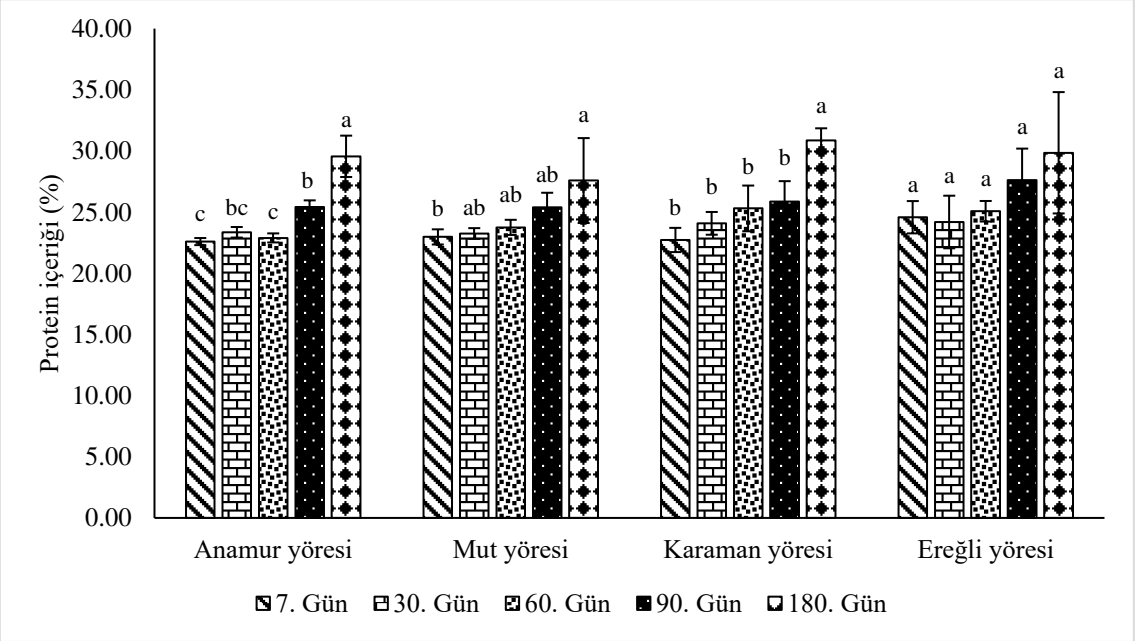
Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	22.59±0.29$^{A, c}$	23.35±0.43$^{A, bc}$	22.89±0.37$^{A, c}$	25.41±0.55$^{A, b}$	29.56±1.69$^{A, a}$
Mut yöresi	22.97±0.62$^{A, b}$	23.25±0.44$^{A, ab}$	23.75±0.62$^{A, ab}$	25.40±1.18$^{A, ab}$	27.58±3.47$^{A, a}$
Karaman yöresi	22.72±0.99$^{A, b}$	24.08±0.93$^{A, b}$	25.30±1.87$^{A, b}$	25.86±1.67$^{A, b}$	30.87±0.98$^{A, a}$
Ereğli yöresi	24.58±1.32$^{A, a}$	24.19±2.15$^{A, a}$	25.07±0.84$^{A, a}$	27.61±2.58$^{A, a}$	29.85±4.96$^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca, tulum peyniri örneklerinin protein içeriğinin yörelere göre değişiklik göstermediği gözlenmiştir ($p>0.05$). Tulum peyniri örneklerinin protein içerikleri olgunlaşma süresinin 7. günü %22.59-24.58 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise %27.58-%30.87 arasında tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Öztürk

(2015) 120 gün boyunca olgunlaştırılan keçi ve inek sütünden üretilen tulum peynirlerinde protein içeriğini %25.49-28.45 arasında saptamıştır. Diğer taraftan, Arslaner (2008) tarafından 90 gün boyunca olgunlaştırılan ve ısıl işlem uygulanmış sütten üretilen Erzincan tulum peynirlerinin protein içeriğini (%27.82-34.77) bu çalışmadan daha yüksek bulunmuştur. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın, ısıl işlem uygulamasının etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tadjine ve ark. (2019) pastörizasyon işleminin (82 °C'de 10 sn) serum proteini denatürasyonuna bağlı olarak peynirde protein içeriğini artırdığını bildirmişlerdir.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin protein içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde protein içeriği olgunlaşma süresinin ilk 60 günü benzer bulunmuş ancak olgunlaşma süresinin 60. gününü takip eden günlerle birlikte artış göstermiştir ($p<0.05$). Mut yöresine ait tulum peynirlerinin protein içeriği ise olgunlaşma süresinin 7. gününden sonra kısmi artış göstermiş olup, en yüksek protein içeriği olgunlaşma süresinin 180. gününde belirlenmiştir ($p<0.05$). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde protein içeriğinin olgunlaşma süresinin sonunda önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bununla birlikte, olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin protein içeriklerinde görülen artışlar istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.8. Olgunlaşma süresi boyunca protein içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Sonuç olarak, olgunlaşma süresince tulum peyniri örneklerinde gözlemlenen nem kaybına ve buna bağlı olarak kuru madde içeriğindeki artışa paralel olarak protein içeriğinde de artış görülmüştür. Bu araştırmanın bulgularını benzer şekilde Arslaner (2008) ve Öztürk (2015) de olgunlaşma süresince tulum peynirlerinde oransal olarak protein miktarının arttığını bildirmiştir.

4.1.9. Toplam azot içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen toplam azot oranları Çizelge 4.9.'da sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen toplam azot içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma sürecinin başlangıcında en yüksek toplam azot içeriği %3.85 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük toplam azot içeriği %3.54 ile Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Benzer şekilde, olgunlaşma süresinin sonunda da en yüksek toplam azot içeriği %4.68 ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük toplam azot içeriği %4.30 ile Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde gözlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde sırasıyla 0.76, 0.72, 0.85 ve 0.83 birim azot artışı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen toplam azot içerikleri (%) (n=3)

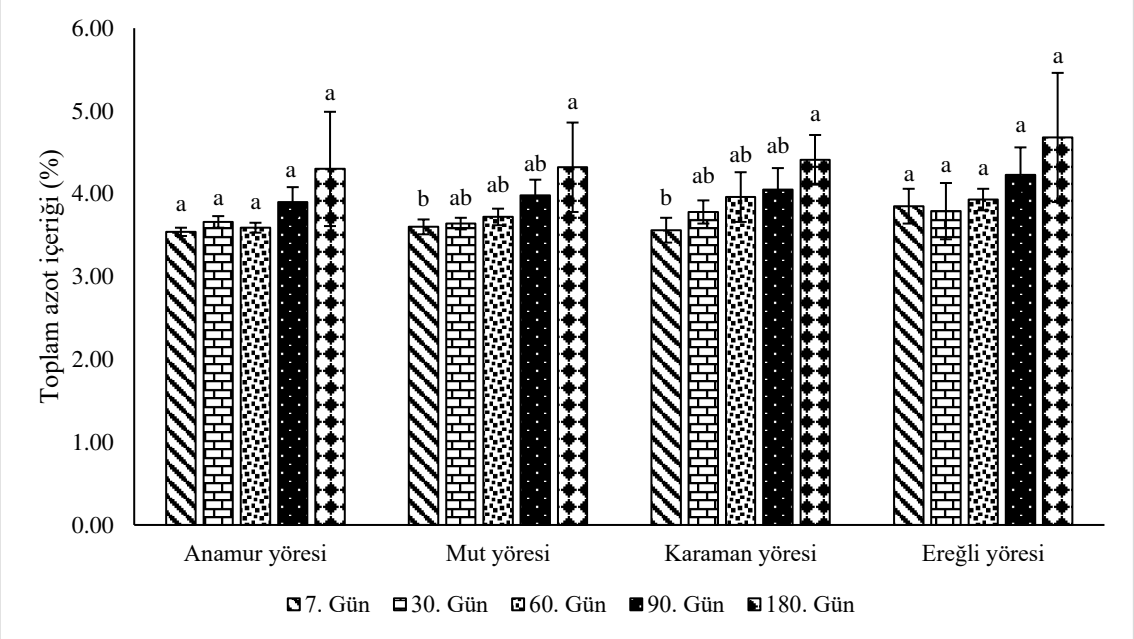
Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	30	60	90	180
Anamur yöresi	$3.54\pm0.05^{A, a}$	$3.66\pm0.07^{A, a}$	$3.59\pm0.06^{A, a}$	$3.90\pm0.18^{A, a}$	$4.30\pm0.69^{A, a}$
Mut yöresi	$3.60\pm0.09^{A, b}$	$3.64\pm0.07^{A, ab}$	$3.72\pm0.10^{A, ab}$	$3.98\pm0.19^{A, ab}$	$4.32\pm0.54^{A, a}$
Karaman yöresi	$3.56\pm0.15^{A, b}$	$3.78\pm0.14^{A, ab}$	$3.96\pm0.30^{A, ab}$	$4.05\pm0.26^{A, ab}$	$4.41\pm0.30^{A, a}$
Ereğli yöresi	$3.85\pm0.21^{A, a}$	$3.79\pm0.34^{A, a}$	$3.93\pm0.13^{A, a}$	$4.23\pm0.33^{A, a}$	$4.68\pm0.78^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca, tulum peyniri örneklerinin toplam azot içeriğinin istatistiksel olarak yörelere göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Genel olarak, tulum peyniri örneklerinin toplam azot içeriği olgunlaşma süresinin başlarında %3.54-3.85 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise %4.30-4.68

arasında gözlemlenmiştir. Elde edilen toplam azot içerikleri, Karaca (2007) tarafından beyaz peynirde belirlenen toplam azot içeriğinden (%2.71-2.99) yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, Gün (2012), Öztürkoğlu (2014) ve Öztürk (2015) olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinin toplam azot içeriklerini sırasıyla %3.02-4.23, %4.62-4.76 ve %3.78-4.68 arasında bularak çalışmamıza yakın sonuçlar tespit etmişlerdir.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin toplam azot içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Anamur ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde toplam azot içeriğinin olgunlaşma süresince artması istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($p>0.05$). Ancak, Mut ve Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresince benzer bir trend gözlenerek toplam azot içeriğinin olgunlaşma süresinin 7. ve 90. gününden sonra kısmi artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresince, nem kaybına bağlı olarak kuru madde içeriğinde meydana gelen artışlar oransal olarak toplam azot miktarının artmasına neden olmuştur. Benzer artışlar, Arslaner (2008) tarafından Erzincan tulum peynirinde, Sert (2011) tarafından koyun, keçi ve inek sütlerinden üretilen tulum peynirlerinde ve Öztürkoğlu (2014) tarafından Divle tulum peynirlerinde belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Olgunlaşma süresi boyunca toplam azot içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-b] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

4.1.10. Suda çözünebilir azot içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

Peynirin olgunlaşması süresince gözlemlenen en önemli değişimlerden biri, bu süreçte gerçekleşen proteoliz sonucunda olgunlaşma derecesinin bir göstergesi olan suda çözünebilir azot miktarında meydana gelen değişimdir (McSweeney ve Fox, 1997). Olgunlaşma süresince peynirde azotlu maddeleri oluşturan kazeinler ve para-κ-kazein; üretimde kullanılan enzimler, sütte doğal olarak bulunan enzimler, starter kültürlere ait enzimler, çiğ sütteki proteolitik mikrobiyotaya ait enzimler, maya ve küflere enzimler gibi peynir ortamında bulunan enzimler ile suda çözünebilir orta ve küçük moleküler ağırlıklı peptidlere, serbest amino asitlere ve azotlu bileşenlere parçalanmaktadır (Ardö ve ark., 2017).

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen suda çözünebilir azot içerikleri Çizelge 4.10.'da sunulmaktadır**.** Tulum peyniri örneklerinden elde edilen suda çözünebilir azot içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında en yüksek suda çözünebilir azot içeriği %0.32 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük suda çözünebilir azot içeriği %0.27 ile Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Benzer trend 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda da gözlenmiş olup, en yüksek suda çözünebilir azot içeriği %0.61 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilirken, en düşük suda çözünebilir azot içeriği %0.54 ile Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde gözlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda tüm tulum peynirlerinde suda çözünebilir azot içeriği yaklaşık 2 katına çıkmıştır ve en yüksek artış Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen suda çözünebilir azot içerikleri (%) (n=3)

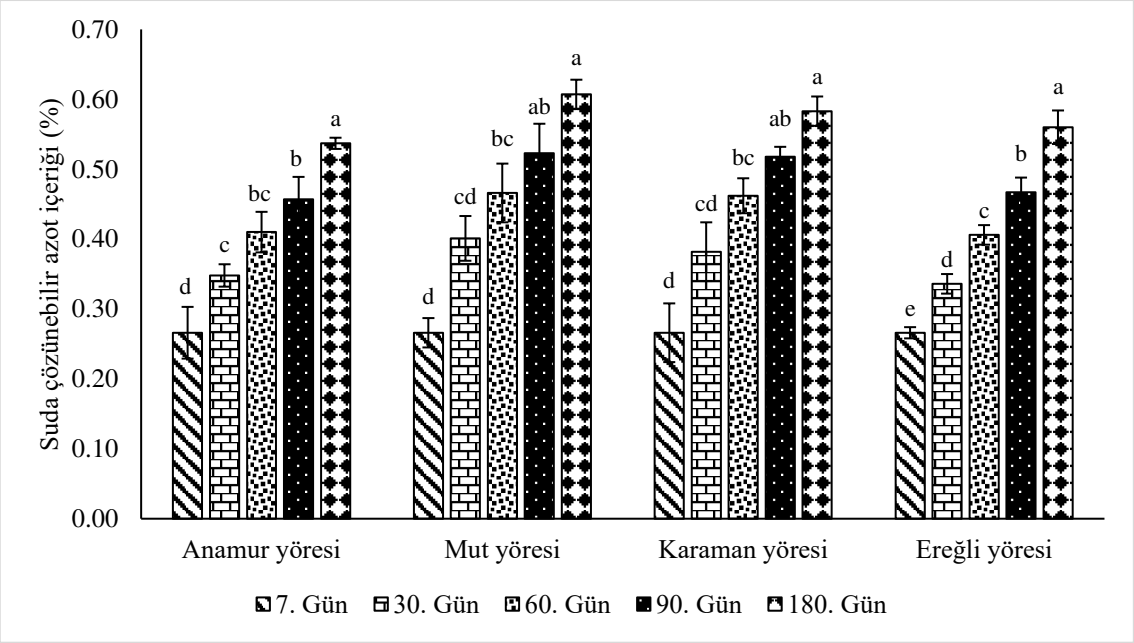
Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	30	60	90	180
Anamur yöresi	$0.27\pm0.04^{A, d}$	$0.35\pm0.02^{A, c}$	$0.41\pm0.03^{A, bc}$	$0.46\pm0.03^{A, b}$	$0.54\pm0.01^{B, a}$
Mut yöresi	$0.32\pm0.02^{A, d}$	$0.40\pm0.03^{A, cd}$	$0.47\pm0.04^{A, bc}$	$0.52\pm0.04^{A, ab}$	$0.61\pm0.02^{A, a}$
Karaman yöresi	$0.30\pm0.04^{A, d}$	$0.38\pm0.04^{A, cd}$	$0.46\pm0.03^{A, bc}$	$0.52\pm0.01^{A, ab}$	$0.58\pm0.02^{AB, a}$
Ereğli yöresi	$0.29\pm0.01^{A, e}$	$0.34\pm0.01^{A, d}$	$0.41\pm0.01^{A, c}$	$0.47\pm0.02^{A, b}$	$0.56\pm0.02^{AB, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-d}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Genel olarak, olgunlaşma süresinin 7. günü suda çözünebilir azot içerikleri %0.27-0.32 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin 180. gününde ise %0.54-0.61 arasında tespit edilmiştir. Bu araştırmada elde edilen suda çözünebilir azot içerikleri Karaca (2007), Sert (2011) ve Öztürkoğlu (2014) tarafından bildirilen değerlere benzerlik gösterirken, Arslaner (2008) ve Gün (2012) tarafından olgunlaşma süresinin sonunda bulunan değerlerden düşük çıkmıştır. Bu farklılıkların kullanılan üretim metodundan, üretimde tercih edilen koagülanttan, elde edilen peynirin kuru madde ve protein içeriğinden, peynirdeki enzimlerin çeşitliliğinden ve olgunlaşma süresinden kaynakladığını düşünülmektedir.

Olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar tulum peynirlerin suda çözünebilir azot içeriklerinin yörelere göre değişmediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Ancak, olgunlaşma süresinin sonunda en yüksek suda çözünebilir azot içeriği Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük suda çözünebilir azot içeriği Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum, olgunlaşma süresinin sonunda tuz içeriğinin Anamur, Karaman ve Ereğli yörelerinde daha yüksek olması nedeniyle ortamdaki proteolitik mikroorganizmaların aktivitesinin azalmasına bağlı olarak meydana gelmiş olabilir.



Şekil 4.10. Olgunlaşma süresi boyunca suda çözünebilir azot içeriklerinde gözlemlenen değişim.
[a-e] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin suda çözünebilir azot içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Tulum peyniri örneklerinde suda çözünebilir azot içeriklerinin olgunlaşma süresine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde suda çözünebilir azot içeriklerinin olgunlaşma süresine paralel olarak devamlı azaldığı tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonuçlarına dayanarak, bu durumun tulum peynirlerindeki α_s- ve β-kazeinlerin ilerleyen olgunlaşma süresi ile yoğun bir şekilde hidrolize olmasından kaynaklandığı görülmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinde gerçekleşen proteolize bağlı olarak suda çözünebilir azot içeriğinin arttığı Arslaner (2008), Sert (2011), Öztürkoğlu (2014) ve Öztürk (2015) tarafından da bildirilmiştir.

4.1.11. Kazein azotu içeriklerine ait sonuçlar ve tartışma

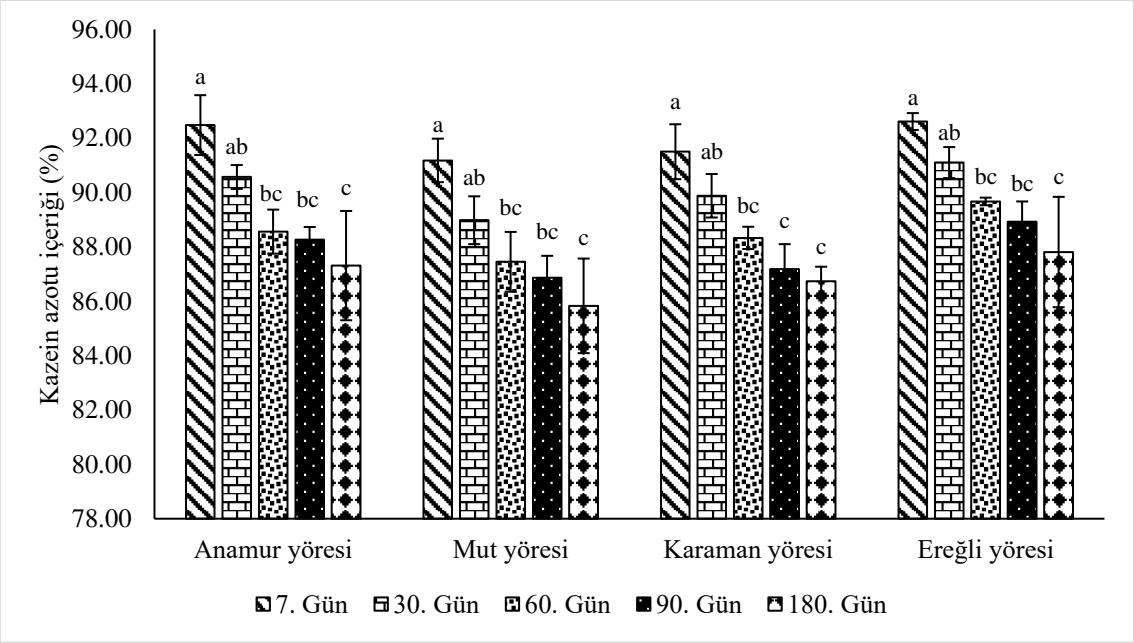
Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen kazein azotu içerikleri Çizelge 4.11.'de sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen kazein azotu içeriklerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 7. günü en yüksek kazein azotu içeriği %92.61 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük kazein azotu içeriği ise %91.18 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Benzer şekilde, olgunlaşma süresinin sonunda en yüksek kazein azotu içeriği %87.81 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ve en düşük kazein azotu içeriği %85.83 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda tüm tulum peynirlerinin kazein azotu içerikleri yaklaşık %5.18-5.87 arasında azalış göstermiştir ve en yüksek azalış Mut yöresine ait tulum peynirlerinde saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen kazein azotu içerikleri (%) (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$92.48\pm1.10^{A, a}$	$90.57\pm0.44^{AB, ab}$	$88.56\pm0.81^{AB, bc}$	$88.27\pm0.46^{AB, bc}$	$87.31\pm2.01^{A, c}$
Mut yöresi	$91.18\pm0.80^{A, a}$	$88.98\pm0.88^{B, ab}$	$87.45\pm1.10^{B, bc}$	$86.86\pm0.81^{B, bc}$	$85.83\pm1.74^{A, c}$
Karaman yöresi	$91.50\pm1.01^{A, a}$	$89.88\pm0.80^{AB, ab}$	$88.33\pm0.41^{AB, bc}$	$87.18\pm0.92^{AB, c}$	$86.74\pm0.53^{A, c}$
Ereğli yöresi	$92.61\pm0.31^{A, a}$	$91.10\pm0.57^{A, ab}$	$89.67\pm0.14^{A, bc}$	$88.92\pm0.75^{A, bc}$	$87.81\pm2.03^{A, c}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresinin başında kazein azotu içerikleri %91.18-92.61 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise %85.83-87.81 arasında tespit edilmiştir. Bu araştırmada elde edilen suda çözünebilir azot içerikleri Karaca (2007), Öztürk (2015) ve Eren Karahan (2016) tarafından bildirilen değerlerle uyumlu bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin ilk ve son günü tulum peynirlerinin kazein azotu içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Diğer taraftan, olgunlaşma süresinin 30., 60. ve 90. günlerinde tulum peynirlerinin kazein azotu içerikleri yörelere göre önemli düzeyde değişmiştir ($p<0.05$) ve ilgili olgunlaşma günlerinde aynı yöresel farklılıklar gözlenmiş olup en yüksek kazein azotu içeriği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum, SDS-PAGE analizi sonuçları ile tutarlık göstermektedir. SDS-PAGE analizinde ilgili periyotlarda α_s- ve β-kazeinlerin en yüksek düzeyde hidrolizi genellikle Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Bununla birlikte, α_s- ve β-kazein türevli en fazla peptid sayısı ve çeşitliliği de Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Yöresel olarak gözlemlenen bu farklılığın üretimde kullanılan sütün, koagülantın ve üretim metodunun farklılığına bağlı olarak kazeinlerin hidrolizinde görev alan proteolitik enzimlerin miktarlarındaki, çeşitlerindeki ve aktivitelerindeki farklılıklardan kaynaklandığı öngörülmektedir.



Şekil 4.11. Olgunlaşma süresi boyunca kazein azotu içeriklerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin kazein azotu içeriklerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Tüm tulum peynirlerinde kazein azotu içeriklerinin olgunlaşma süresinin sonunda önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin kazein azotu içeriğinde istatistiksel olarak benzer bir azalış trendi gözlenmiştir. İlgili yörelerde, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 30. ve 90. günlerinden sonra kazein azotu içeriklerinin önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 30. ve 60. günlerinden sonra kazein azotu içerikleri önemli düzeyde azalış göstermiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresi boyunca kazein içeriğindeki benzer azalış Karaca (2007), Öztürk (2015) ve Eren Karahan (2016) tarafından da rapor edilmiştir. Olgunlaşma süresince kazein azotu içeriklerinde gözlenen azalış, peynirde gerçekleşen proteoliz ile α_s- ve β-kazeinlerin çeşitli boyuttaki peptidlere ve amino asitlere hidrolize olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, bu çalışmadan elde edilen elektroforetik ve kromatografik analiz sonuçları da bunu doğrulamaktadır. Bu analizler, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_s- ve β-kazeinlerin yüksek düzeyde hidrolize olduğunu ve α_s- ve β-kazein türevli çok sayıda peptidin meydana geldiğini göstermektedir. Bu süreçte proteolitik enzimlerin önemli bir rol aldığı, Karaca (2007) tarafından yürütülen çalışmada gözlemlenmiştir ve ilgili araştırmacı proteolitik enzim ilave edilen peynirlerde kazein azotu içeriğinde meydana gelen azalışın daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmiştir.

4.1.12. Olgunlaşma derecesi değerlerine ait sonuçlar ve tartışma

Suda çözünen azotun toplam azota oranı olarak tanımlanan olgunlaşma derecesi, peynirlerin olgunlaşmasının takip edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu parametreler üzerinde etkili olan faktörler, tulum peynirlerinin olgunlaşma derecesi üzerinde de etkilidir. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen olgunlaşma derecesi değerleri Çizelge 4.12.'de gösterilmektedir. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen olgunlaşma derecesi değerlerine ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilk günü en yüksek olgunlaşma derecesi %8.82 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük olgunlaşma derecesi ise %7.39 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit

edilmiştir. Benzer şekilde olgunlaşma süresinin sonunda da en yüksek olgunlaşma derecesi %14.17 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenirken, en düşük olgunlaşma derecesi %12.19 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda tüm tulum peynirlerinin olgunlaşma derecesi yaklaşık %56-69 arasında artış göstermiştir ve en yüksek artış Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde saptanmıştır. Sert (2011) 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda olgunlaşma süresinin başına kıyasla tulum peynirlerinin olgunlaşma derecesinin yaklaşık %56 oranında arttığını bildirmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen olgunlaşma derecesi değerleri (%) (n=3)

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$7.52\pm1.10^{A, c}$	$9.43\pm0.44^{AB, bc}$	$11.44\pm0.81^{AB, ab}$	$11.73\pm0.46^{AB, ab}$	$12.69\pm2.01^{A, a}$
Mut yöresi	$8.82\pm0.80^{A, c}$	$11.02\pm0.88^{A, bc}$	$12.55\pm1.10^{A, ab}$	$13.14\pm0.81^{A, ab}$	$14.17\pm1.74^{A, a}$
Karaman yöresi	$8.50\pm1.01^{A, c}$	$10.12\pm0.80^{AB, bc}$	$11.67\pm0.41^{AB, ab}$	$12.82\pm0.92^{AB, a}$	$13.26\pm0.53^{A, a}$
Ereğli yöresi	$7.39\pm0.31^{A, c}$	$8.90\pm0.57^{B, bc}$	$10.33\pm0.14^{B, ab}$	$11.08\pm0.75^{B, ab}$	$12.19\pm2.03^{A, a}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-c}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

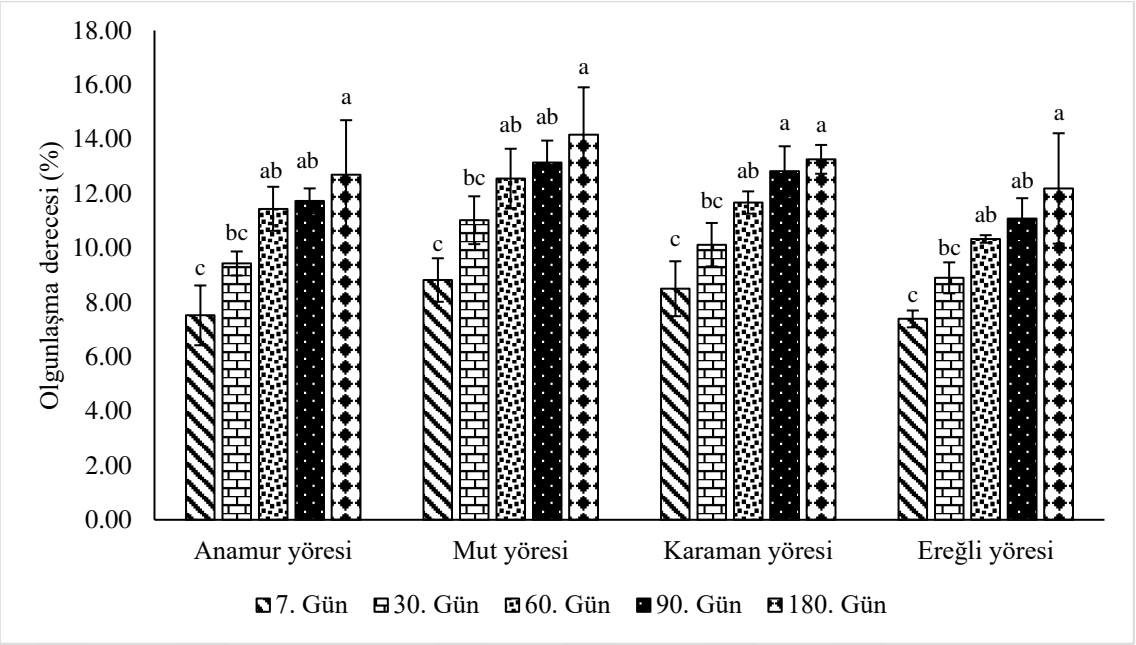
Olgunlaşma süresinin başında olgunlaşma dereceleri %7.39-8.82 arasında belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise %12.19-14.17 arasında tespit edilmiştir. Bu araştırmada elde edilen olgunlaşma dereceleri Öztürk (2015) ve Eren Karahan (2016) tarafından bildirilen değerlerle benzerlik gösterirken, Sert (2011) ve Gün (2012) tarafından rapor edilen değerlerden düşük bulunmuştur. Gözlemlenen bu farklılıkların; kullanılan üretim metoduna, sütün bileşimine, koagülantın özelliklerine ve ambalaj malzemesine göre değişen kuru madde oranlarına ve proteoliz düzeylerine bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Sert (2011), tulum peyniri üretiminde koyun sütüne keçi ve inek sütlerinin karıştırılması sonucu olgunlaşma derecesinin azaldığını belirlemiştir. Ayrıca, Eren Karahan (2016) yağlı peynirlerin olgunlaşma derecesinin yağsız peynirlerden daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Gün (2012) yüksek oksijen geçirgenliğine sahip ambalaj malzemesinde olgunlaştırılan tulum peynirlerinin olgunlaşma derecesinin daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Olgunlaşma süresinin 7. ve 180. günleri tulum peynirlerinin olgunlaşma dereceleri arasında yöresel bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak, olgunlaşma süresinin 30., 60. ve 90. günlerinde tulum peynirlerin olgunlaşma derecesinin yöresel olarak önemli düzeyde değiştiği tespit edilmiştir. İlgili olgunlaşma günlerinde en yüksek olgunlaşma

derecesi Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük olgunlaşma derecesi ise Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuç, belirtilen olgunlaşma günlerinde Mut yöresine ait tulum peynirlerinin kuru madde oranının azalmasına bağlı olarak toplam azot oranının da azalması ve suda çözünebilir azot oranın daha yüksek olması ile uyumluluk göstermektedir. Doğal süt enzimlerinin, koagülanttaki enzimlerin ve peynirdeki mikrobiyotadan kaynaklanan enzimlerin miktarı, çeşidi ve aktivesine bağlı olarak olgunlaşma derecesi değişiklik gösterebilmektedir (Fox, 1988). Dolayısıyla, Tulum peyniri örneklerinde yöresel olarak gözlemlenen bu farklılıkların üretimde kullanılan çiğ süte, koagülanta ve üretim metoduna göre değiştiği düşünülmektedir. Ozcan ve Kurdal (2012) tarafından proteaz enzimi ilave edilen peynirlerin olgunlaşma derecesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Olgunlaşma süresi boyunca tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma derecesi değerlerinde meydana gelen değişim grafik olarak Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Tüm tulum peynirlerinde olgunlaşma derecesi olgunlaşma süresi boyunca önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$). Bu kapsamda, olgunlaşma süresi ile olgunlaşma derecesi arasında bir korelasyonun olduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin olgunlaşma dereceleri istatistiksel olarak benzer bir artış eğilimi göstermiştir. Bahsi geçen yörelerde, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 30. ve 90. günlerinden sonra olgunlaşma derecelerinin önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 30. ve 60. günlerinden sonra olgunlaşma dereceleri önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresi boyunca olgunlaşma derecesinin artması peynirde mevcut olarak bulunan enzimlerden, özellikle mikrobiyal kökenli olanlardan, kaynaklanan proteolitik aktivitenin sürdüğünü göstermektedir. Tulum peyniri üzerine gerçekleştirilen çoğu çalışmada olgunlaşma süresinin ilerlemesiyle birlikte olgunlaşma derecesinin arttığı bildirilmiştir (Arslaner, 2008; Sert ve Akın, 2008; Gün, 2012; Öztürkoğlu, 2014; Öztürk, 2015). Gürsoy (2005) olgunlaşma derecesinde gözlemlenen değişimin azotlu bileşiklerin suda çözünebilir forma dönüşmesiyle doğrusal bir ilişkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmada, olgunlaşma süresi boyunca artan suda çözünebilir azot oranının olgunlaşma derecesine yansıdığı görülmektedir.



Şekil 4.12. Olgunlaşma süresi boyunca olgunlaşma derecelerinde gözlemlenen değişim. [a-c] Farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırma süresince istatistiksel olarak farklılığını göstermektedir ($p<0.05$).

4.2. Elektroforez Analizi Sonuçları ve Tartışma

Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca SDS-PAGE analizi ile elde edilen sonuçların densitometrik analizleri yapılarak hidrolize olan α_s-, β- ve κ-kazein oranları tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresince tulum peyniri örneklerinde belirlenen α_s-, β- ve κ-kazeinlerin oranları Çizelge 4.13., 4.14. ve 4.15'te sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinden elde edilen α_s-, β- ve κ-kazeinlerin oranlarına ait sonuçlara Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak olgunlaşma süreleri ve yöreler arasındaki farklar belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen α_s-kazein oranları (%) (n=3)

Tulum peynirleri	**α_s-kazein (%)**				
	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$84.75\pm2.88^{AB, b}$	$71.42\pm0.96^{A, c}$	$67.83\pm0.08^{A, c}$	$55.41\pm0.24^{A, d}$
Mut yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$92.59\pm3.42^{A, a}$	$71.58\pm6.88^{A, b}$	$60.43\pm2.07^{A, c}$	$48.04\pm0.73^{AB, d}$
Karaman yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$61.60\pm20.14^{B, ab}$	$66.36\pm17.43^{A, ab}$	$52.68\pm18.34^{A, b}$	$35.49\pm0.61^{AB, b}$
Ereğli yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$72.64\pm5.00^{AB, b}$	$61.08\pm3.83^{A, bc}$	$45.26\pm4.76^{A, cd}$	$25.80\pm17.60^{B, d}$

[A-B] Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
[a-d] Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Olgunlaşma süresinin 30. gününde tulum peynirlerinin α_s-kazein oranlarının yaklaşık % 7.41-38.40 arasında azaldığı belirlenmiştir. İlgili olgunlaşma süresinde en yüksek α_s-kazein hidroliz oranı Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin 60. gününde ise tulum peyniri örneklerinde α_s-kazein oranlarının yörelere göre değişiklik göstermediği ($p>0.05$) ve %61.08-71.58 arasında olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, olgunlaşma süresinin 90. gününde de tulum peyniri örneklerinde α_s-kazein oranlarının yörelere göre değişiklik göstermediği ($p>0.05$) ve %45.26-67.83 arasında olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise tulum peynirlerinde α_s-kazeinlerin %25.80-55.41 arasında hidrolize olmadan kaldığı belirlenmiş, en düşük kazeinin oranı yani en yüksek hidroliz oranı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Kromatografik analiz sonuçlarında, α_s-kazein türevli en fazla peptid çeşitliliğinin de Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde görülmesi bu sonucu doğrulamaktadır.

Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılıklar tulum peynirlerinde bulunan proteolitik enzimlerin çeşitliliğinin, aktivitesinin ve miktarının değişimi ile meydana gelmiş olabilir (Ardö ve ark., 2017). Bu değişimlerin; peynir üretiminde kullanılan koagülantın bileşimindeki enzimlerin konsantrasyonlarına, çiğ sütün kompozisyonuna ve çiğ sütün mikrobiyotasına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Ayrıca, üretim metodundaki farklılıklara bağlı olarak tulum peynirlerinde kalan koagülant miktarı değişiklik gösterebilir. Peynirde kalan koagülantın ilk olarak α_s-kazein üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1997). Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde sütte doğal olarak bulunan plazmin enzimi ve mikrobiyal peptidazlar veya proteinazlar α_s-kazeinlerin parçalanmasına neden olmaktadır. Demirci (2019) Karaman, Ereğli, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyotanın yöresel olarak önemli düzeyde değiştiğini bildirmiştir. Dolasıyla, bu yörelere ait peynirlerde çok farklı ve çeşitli mikrobiyal proteolitik enzimlerin bulunması muhtemeldir.

Bu çalışmada, 180 günlük depolama süresinin sonunda elde edilen α_s-kazein oranları, Moatsou ve ark. (2004) tarafından 180 günlük olgunlaşma süresi sonunda Feta peynirinde tespit edilen değerlerle, Karaca (2007) tarafından proteolitik enzim ilavesi yapılan beyaz peynirlerde 90 günlük olgunlaşma süresi sonunda belirlenen değerlerle ve Tuncel ve ark. (2010) tarafından 360 günlük olgunlaşma süresinin sonunda Ezine peynirinde saptanan değerlerle benzerlik göstermiştir. Say (2008) farklı tuz konsantrasyonlarında sulu haşlama yöntemi ile üretilen kaşar peynirlerinin α_s-kazein

oranlarını 60 günlük olgunlaşma süresi sonunda %67.06-80.24 arasında belirlerken, Barać ve ark. (2013) keçi sütünden üretilen salamura peynirlerinin 60 günlük olgunlaşma süresi sonunda α_s-kazein oranlarını %61.10 olarak tespit etmişlerdir. Bu rakamlar, çalışma sonuçlarımızdan oldukça yüksek görünmektedir. Say (2008) haşlama suyunda artan tuz konsantrasyonlarının kaşar peynirlerinde α_s-kazeinlerin parçalanmasını azalttığını bildirmiştir. Diğer taraftan, St-Gelais ve Haché (2005) tarafından 360 günlük olgunlaşma süresinin sonunda mezofilik laktokokal kültürler ile üretilen peynirlerde belirlenen α_s-kazein oranları (<%20) bu çalışmadan elde edilen sonuçlardan düşük bulunmuştur.

Çizelge 4.14. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen β-kazein oranları (%) (n=3)

Tulum peynirleri	β-kazein (%)				
	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	30	60	90	180
Anamur yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$92.90\pm1.43^{A, b}$	$75.06\pm1.92^{A, c}$	$68.83\pm0.77^{A, d}$	$48.25\pm0.08^{A, e}$
Mut yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$90.37\pm3.37^{AB, a}$	$75.96\pm7.26^{A, b}$	$66.93\pm2.26^{A, b}$	$43.92\pm2.72^{AB, c}$
Karaman yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$86.94\pm1.38^{AB, b}$	$73.01\pm0.41^{A, c}$	$54.75\pm4.18^{B, d}$	$37.90\pm4.39^{B, e}$
Ereğli yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$85.04\pm3.12^{B, b}$	$67.55\pm3.57^{A, c}$	$62.50\pm1.54^{A, c}$	$46.72\pm4.57^{AB, d}$

$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).
$^{a-e}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Çizelge 4.14. incelendiğinde, olgunlaşma süresinin 30. gününde tulum peynirlerinin β-kazein oranları %85.04-92.90 arasında belirlenmiş olup, yörelere göre β-kazein oranlarının önemli ölçüde değişkenlik gösterdiği görülmektedir ($p<0.05$). İlgili olgunlaşma süresinde en yüksek β-kazein hidroliz oranı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir ($p<0.05$). Tıpkı α_s-kazeinde olduğu gibi, olgunlaşma süresinin 60. gününde tulum peyniri örneklerinde β-kazein oranlarının yörelere göre gösterdiği fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$) ve %67.55-75.96 arasında olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde ise β-kazein oranlarının yörelere göre önemli düzeyde değişiklik gösterdiği ($p<0.05$) ve en düşük β-kazein oranının Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu belirlenmiştir. Peptidlerin kromatografik analizine dayanarak, β-kazein türevli en fazla peptid çeşitliliğinin Karaman yöresinde belirlenmesi bu sonuçlarla tutarlılık göstermektedir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise tulum peynirlerinde %37.90-48.25 arasında β-kazeinin hidrolize olmadan kaldığı belirlenmiş, en fazla hidroliz Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir ($p<0.05$).

β-kazeinin koagülantta bulunan kimozin ile parçalanmasının çok sınırlı olduğu ve β-kazeinin hidrolizinde sütün doğal enzimi olan plazminin daha etkili olduğu bildirilmektedir (Ardö ve ark., 2017). Ayrıca, β-kazeinin olgunlaşma süresi boyunca mikrobiyal proteolitik enzimlerle ileri derece parçalandığı rapor edilmiştir (Taivosalo ve ark., 2018). Kandarakis ve ark. (2001) mikrobiyal proteazların β-kazeinin parçalanması üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Karaca (2007) proteolitik enzim ilavesinin beyaz peynirlerde β-kazein hidrolizini hızlandırdığını tespit etmiştir. Dolayısıyla, Tulum peynirlerinde mevcut proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlı olarak yöreler arasında gözlemlenen farklılıkların üretim metoduna, kullanılan peynir mayasının bileşimine, kaynağına ve konsantrasyonuna, çiğ sütte bulunan proteolitik enzimlere ve çiğ sütün mikrobiyotasına dayandığı söylenebilir. Daha önce de bildirildiği gibi, Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde mikrobiyota yöresel olarak değişkenlik göstermektedir (Demirci, 2019). Bu farklılığın, tulum peynirlerinde belirlenen β-kazein oranlarını yöresel olarak etkilediği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, 180 günlük depolama süresinin sonunda gözlemlenen β-kazein oranları, beyaz peynirde (Karaca, 2007), Ezine peynirinde (Tuncel ve ark., 2010) ve salamura keçi peynirinde (Barać ve ark., 2013) olgunlaşma süresi sonunda belirlenen değerlerden oldukça düşük bulunmuştur. Bu peynirlere kıyasla, tulum peynirlerinde β-kazein hidrolizinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar tulum peynirinin ısıl işlem uygulanmadan üretilmesine, üretiminde yüksek tuz konsantrasyonları kullanılmamasına ve uzun süre olgunlaştırılmasına bağlı olarak proteolitik enzim aktivitesinin yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Chaves ve Grosso (1999) buzdolabı koşullarında 1 ay depolanan Mozzarella peynirlerinde β-kazeinin γ_1, γ_2 ve γ_3 kazeinlerine parçalandığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.15. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin olgunlaşma süresince belirlenen κ-kazein oranları (%) (n=3)

Tulum peynirleri	**κ-kazein (%)**				
	Olgunlaşma süresi (gün)				
	7	**30**	**60**	**90**	**180**
Anamur yöresi	$100\pm0.00^{A, ab}$	$99.37\pm2.10^{AB, ab}$	$96.79\pm0.59^{A, b}$	$103.89\pm0.33^{A, a}$	$100.90\pm3.42^{A, ab}$
Mut yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$93.46\pm0.55^{AB, b}$	$99.14\pm1.79^{A, a}$	$97.11\pm0.28^{A, a}$	$97.98\pm1.89^{A, a}$
Karaman yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$92.16\pm6.87^{B,a b}$	$77.45\pm1.11^{A, bc}$	$64.26\pm8.47^{B, cd}$	$55.56\pm9.51^{B, d}$
Ereğli yöresi	$100\pm0.00^{A, a}$	$103.40\pm2.66^{A, a}$	$87.59\pm9.50^{A, a}$	$103.84\pm7.76^{A, a}$	$100.70\pm5.31^{A, a}$

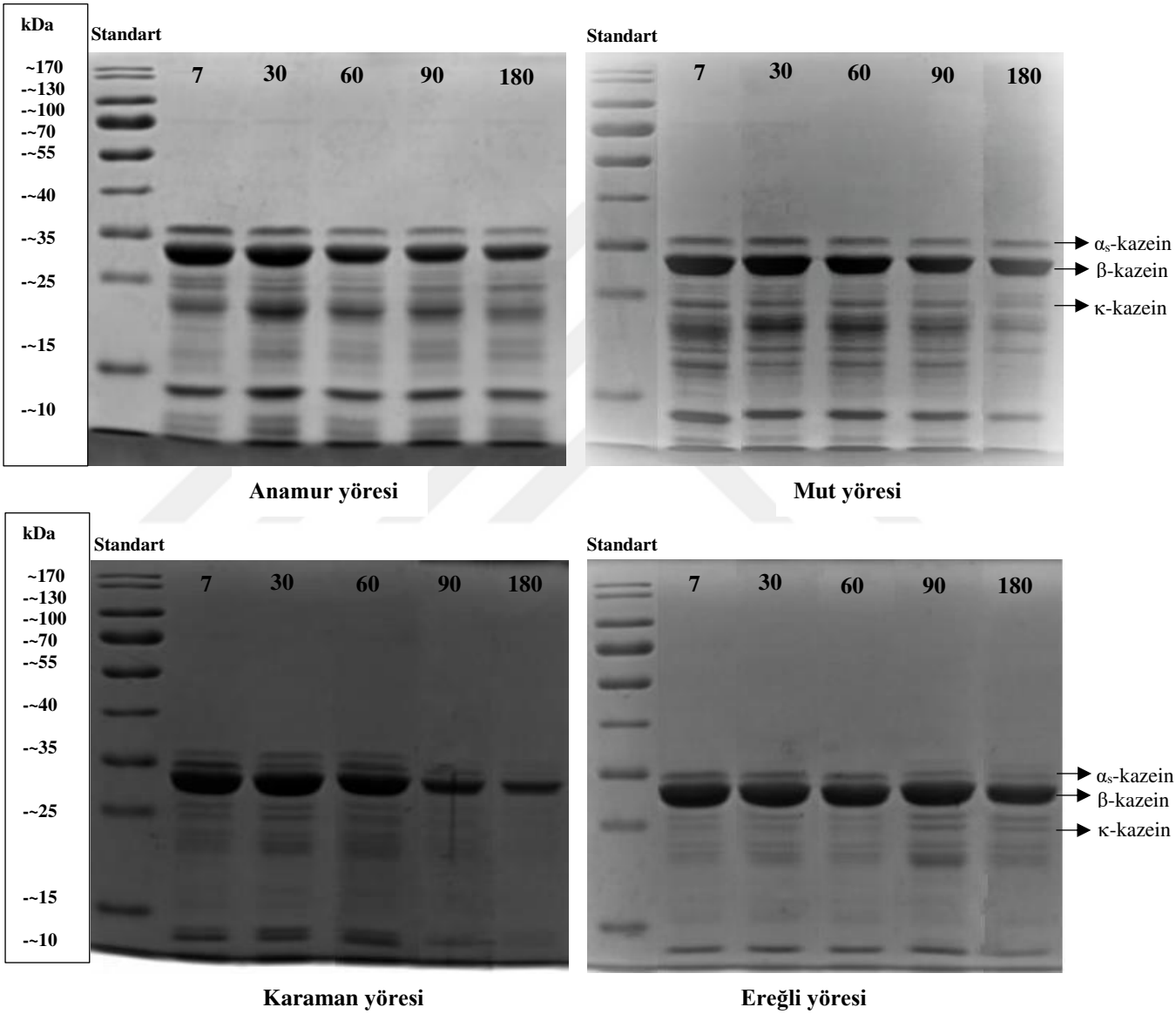
$^{A-B}$ Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak yöresel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

$^{a-e}$ Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak olgunlaştırma süreleri arasındaki farkı göstermektedir ($p<0.05$).

Çizelge 4.15.'e göre, olgunlaşma süresinin 30. gününde tulum peynirlerinin κ-kazein oranları %92.16-103.40 arasında tespit edilerek, yöresel olarak κ-kazein oranlarının önemli ölçüde değişkenlik gösterdiği görülmektedir. İlgili olgunlaşma süresinde en yüksek κ-kazein hidroliz oranı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilirken, en düşük κ-kazein oranı ise Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin 60. gününde tulum peyniri örneklerinde κ-kazein oranlarının yörelere göre değişiklik göstermediği ($p>0.05$) ve %77.45-99.14 arasında olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde ise κ-kazein oranlarının yörelere göre önemli düzeyde farklılık gösterdiği ve en düşük κ-kazein oranının Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin sonunda Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde κ-kazein oranının sabit kaldığı, ancak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise κ-kazein hidrolizinin gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum, κ-kazein türevli peptidlerin yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde görülmesini açıklamaktadır. κ-kazeinin kimozin ve plazmin enzimine karşı dirençli olduğu ve mikrobiyal proteolitik enzimlerle az miktarda parçalandığı bildirilmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1993; Bastian ve ark., 1997). Dolayısıyla, κ-kazein türevli peptidlerin yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmesi farklı mikrobiyal enzimlerin bulunmasından kaynaklanmış olabilir.

κ-kazeinin koagülant ile parçalanması sonrasında peynirde kalan *para*-κ-kazeinin proteolize karşı daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir (Ardö ve ark., 2017). *Para*-κ-kazeinin kimozin ile ileri derecede hidrolize olmadığı, ancak, sütün doğal enzimi olan plazmin veya mikrobiyal proteolitik enzimler aracılığıyla olgunlaşma sırasında peynirde az miktarda hidrolize olduğu bildirilmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1993). Diğer taraftan, bazı çalışmalarda da *para*-κ-kazein oranının sabit kaldığı öne sürülmüştür (Vicente ve ark., 2001). Dolayısıyla, yöresel olarak gözlemlenen farklılıkların mikrobiyal dinamiğin farklılığından, üretim metodundaki değişimlerden ve kullanılan sütün özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Demirci (2019) Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirleri ile kıyaslandığında Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, özellikle olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde, göreceli olarak yüksek bir popülasyon çeşitliliği gözlemiştir. Mikrobiyal popülasyondaki, bu farklılığın *para*-κ-kazeinin hidrolizine yansıdığı öngörülmektedir.

Şekil 4.13.'te 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinden elde edilen elektroforetogramlar sunulmaktadır. Örneklerin ilk kuyucuğuna moleküler ağırlık standardı (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder-10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130 ve 170 kDa) yüklenmiş olup devam eden kuyucuklara ise sırasıyla olgunlaşma süresinin 7., 30., 60., 90. ve 180. günlerine ait tulum peynirlerinden elde edilen protein izolatları yüklenmiştir.



Şekil 4.13. Farklı yörelere ait tulum peynirlerinin olgunlaşma süresince gözlemlenen SDS-PAGE elektroforetogramları. 7: 7. gün, 30: 30. gün, 60: 60. gün, 90: 90. gün, 180: 180. gün. İlk kuyucukta moleküler ağırlık standardı bulunmaktadır.

Elde edilen jellerin kantitatif değerlendirilmesi sonucunda, olgunlaşma süresine paralel olarak α_s- ve β-kazein oranlarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Jin ve Park (1996), Karaca (2007), Say (2008) ve Barać ve ark. (2013) olgunlaşma süresinin sonunda peynirlerde α_s- ve β-kazein oranlarının yüksek derecede azaldığını belirlemişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca α_s-kazeinin en yüksek oranda hidrolizinin olgunlaşma süresinin 7. ve 30. gününden sonra olduğu görülmektedir. Bu durumun, peynirde olgunlaşma süresinin başlarında kalan rennet aktivitesinin yüksek olmasından kaynakladığı düşünülmektedir. Bansal ve ark. (2007) artan asitlik değerlerine bağlı olarak peynir mayasında bulunan rennin enzimi aktivitesinin peynirde azaldığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla, olgunlaşma süresine bağlı olarak tulum peynirlerinde artan asitlik değerleri göz önünde bulundurulduğunda α_s-kazeinin hidroliz oranının azalması şaşırtıcı değildir. β-kazeinin en yüksek oranda hidrolizi ise olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, olgunlaşma süresine bağlı olarak belirlenen peptid sayısı ile de uyumlu bulunmuştur. Özetle, en fazla α_s-kazein hidrolizi olgunlaşma süresinin başlarında gözlemlenirken, en yüksek β-kazein hidrolize ise olgunlaşma süresinin sonlarında belirlenmiştir. Bu durum, mikrobiyal enzimlerin β-kazein üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Mikrobiyal gelişimin tulum peynirlerinde zamanla artış gösterdiği titrasyon asitliğinde gözlemlenen artış ile de görülmektedir. Genellikle mikrobiyal proteazların α_s-kazeine kıyasla β-kazein üzerinde daha etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Nuñez ve ark., 1991; Picon ve ark., 1995; Seneweera ve ark., 2006). Bunlara ek olarak, Karaca (2007) mikrobiyal proteolitik enzim ilavesinin beyaz peynirlerde β-kazeinin hidrolizini artırdığını bildirmiştir.

Bununla birlikte, κ-kazeinin olgunlaşmasına süresine bağlı olarak Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde stabil olarak kaldığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Vicente ve ark. (2001) 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda Idiazabal peynirinde κ-kazein oranının aynı kaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Barać ve ark. (2013) salamura keçi peynirlerinin 60 günlük olgunlaşma süresince κ-kazein oranının değişmediğini belirlemişlerdir. Thorn ve ark. (2014) κ-kazeinin termodinamik ve kinetik olarak stabil olduğunu ve proteolize karşı direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durum, κ-kazeindeki disülfit bağlarının yüksek düzeyde kararlılık sağlamasına bağlanabilir (Bhat ve ark., 2016). Genellikle, gerçekleştirilen çoğu çalışmada, κ-kazein oranının aynı kaldığı veya düşük miktarda azaldığı gözlemlenmiştir (Gagnaire ve ark., 2011; Fontenele ve ark., 2017). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise, olgunlaşma süresine bağlı olarak α_s-

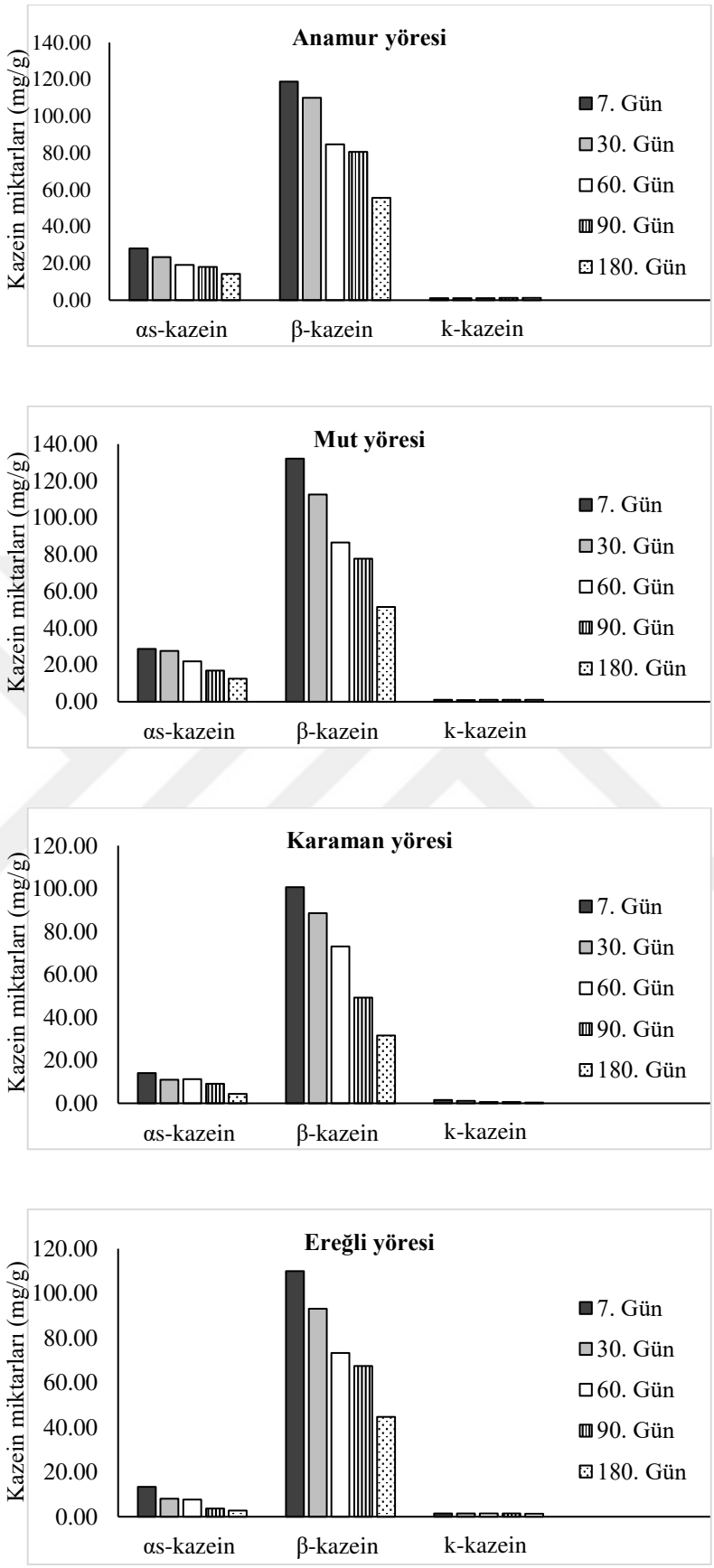
ve β-kazeinde olduğundan daha az bir şekilde κ-kazein oranının da azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu azalma κ-kazeinin hidrolize olduğunu göstermektedir ve kromatografik analiz sonuçlarında da κ-kazein türevli peptidlerin yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde görülmesi bu sonuç ile tutarlılık göstermektedir.

Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde β-kazeinlerin hidroliz oranının α_s-kazeinlerin hidroliz oranlarından daha yüksek olduğu görülmüş olup, κ-kazeinin ise hidrolize olmadığı gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise β-kazeine kıyasla α_s-kazeinin daha fazla hidrolize olduğu belirlenmiş olup, en düşük hidrolize olma oranı κ-kazeinde belirlenmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde κ-kazein parçalanması gözlemlenmemiştir ve en yüksek α_s-kazein hidroliz oranı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Anamur ve Mut yörelerinde β-kazein daha hızlı hidrolize olurken, Karaman ve Ereğli yörelerinde α_s-kazein daha hızlı hidrolize olmuştur. β-kazein daha az parçalandığı peynirlerde plazmin aktivitesinin daha sınırlı olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla, yöresel olarak tespit edilen farklılıklar üretim metodundaki ve sütün kompozisyonundaki farklılıklarla ilişkili olmaktadır. α_s-kazein ve β-kazein arasında gözlemlenen bu zıt durum çeşitli çalışmalar tarafından da görülmüştür. Karaca (2007), Tuncel ve ark. (2010) ve Barać ve ark. (2013) peynirlerin olgunlaşma süresi boyunca en fazla hidrolizin α_s-kazeinde olduğunu tespit etmişlerdir. Öte yandan, Nuñez ve ark. (1991) ve Picon ve ark. (1995) Manchego peynirlerinin olgunlaşma süresinin sonunda β-kazeinin α_s-kazeine kıyasla daha yüksek oranda hidrolize olduğunu bildirmişlerdir. Seneweera ve ark. (2006) *Aspergillus* küfünden elde edilen bir proteaz enziminin olgunlaşma sürecince peynirde α_s- ve κ-kazeine kıyasla β-kazeinin daha hızlı hidrolize olduğunu belirlemişlerdir. Centeno ve ark. (1994) çiğ sütten üretilen Arzua peynirlerinde β-kazeinin daha fazla hidrolize olduğunu belirlerken, ticari *Lactococcus* suşları kullanılarak üretilen Arzua peynirlerinde ise α_s-kazeinin daha yüksek oranda hidrolize olduğunu gözlemlemişlerdir. Farklı mikroorganizmalara ait proteazların farklı protein spesifikliğine sahip olduğu görülmektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinin α_s-, β- ve κ-kazein miktarlarındaki (mg/g) farklılıkları gözlemlemek amacıyla Şekil 4.14. düzenlenmiştir. Genellikle, α_s-kazein miktarlarının Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde daha yüksek olduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresinin başında örneklerin α_s-kazein miktarları 13.41-28.78 mg/g arasında tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak tüm yörelere ait tulum peynirlerinde gerçekleşen

proteolize bağlı olarak α_s-kazein miktarlarının azaldığı Şekil 4.14.'ten de görülmektedir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise α_s-kazein miktarları 2.74-14.56 mg/g arasında belirlenmiş olup, en yüksek α_s-kazein miktarı Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Bu farklılıklar üretimde kullanılan sütlerin kompozisyonundan ve farklı kombinasyon oranlarından kaynaklanmış olabilir. Bilindiği gibi tulum peynirleri, koyun, keçi ve inek sütlerinden üretildiği gibi bunların belirli kombinasyonları kullanılarak de üretilmektedir. Pecka-Kiełb ve ark. (2018) en fazla α_s-kazeinin koyun sütünde bulunduğunu ve bunu sırasıyla inek ve keçi sütlerinin takip ettiğini bildirmişlerdir. Dolasıyla, Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinde koyun veya inek sütü miktarının daha yüksek olduğu düşünülebilir. Diğer taraftan, peynir yapımı sırasında yüksek koagülant aktivitesine bağlı olarak daha fazla oranda α_s-kazeinin peptidlere parçalanması sonucu Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde α_s-kazein miktarı daha düşük çıkmış olabilir.

Genel olarak, β-kazein miktarlarının yöresel olarak değiştiği görülmektedir ve tulum peynirlerinde belirlenen en yüksekten en düşüğe β-kazein miktarları sırasıyla Mut, Anamur, Ereğli ve Karaman yörelerinde gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında örneklerin β-kazein miktarları 132.03-100.68 mg/g arasında tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile tüm yörelere ait tulum peynirlerinde gerçekleşen proteolize bağlı olarak β-kazein miktarlarının da azaldığı Şekil 4.14.'ten anlaşılmaktadır. Olgunlaşma süresinin sonunda ise β-kazein miktarları 31.52-55.56 mg/g arasında belirlenmiş olup, en düşük miktarı β-kazein hidrolizin en yüksek olduğu Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Bu araştırma sonuçlarına benzer şekilde Muller-Renaud ve ark. (2004) çiğ sütten üretilen İsviçre tipi peynirlerde 183 günlük olgunlaşma süresi boyunca zamana bağlı olarak β-kazein miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar olgunlaşma süresinin başında β-kazein miktarını 96-108 mg/g arasında belirlerken, olgunlaşma süresinin sonunda ise β-kazein miktarını 12.6-29 mg/g arasında tespit etmişlerdir. Tulum peynirlerinde β-kazein miktarının, α_s-kazein miktarından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun, peynir yapımını takiben α_s-kazeinin rennet aktivitesi ile yüksek düzeyde parçalanmasından kaynakladığı düşünülmektedir (Fox ve McSweeney, 1997). Charalambides ve ark. (1995) tarafından da farklı sertlik derecelerine sahip Cheddar peynirlerinde β-kazein miktarının α_s-kazein miktarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı yörelere ait tulum peynirlerinin olgunlaşma süresi boyunca kazein miktarlarında (mg/g) gözlemlenen değişim.

Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peyniri örneklerinin κ-kazein miktarları Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden daha yüksek çıkmıştır. Bu durum, peynir üretimde kullanılan süt kompozisyonundaki farklılıkları yansıtmaktadır. Olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenen κ-kazein hidrolizine bağlı olarak bu yöreye ait tulum peynirlerin κ-kazein miktarları özellikle olgunlaşma süresinin 60. gününden sonra diğer yörelerden daha düşük bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin başında örneklerin κ-kazein miktarları 1.15-1.50 mg/g arasında olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca, Karaman yöresi dışında diğer yörelere ait tulum peynirlerinin κ-kazein miktarlarının neredeyse aynı kaldığı tespit edilmiştir. Proteolize karşı en dirençli kazein olan κ-kazeinin miktarında gözlemlenen bu durum şaşırtıcı değildir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise κ-kazeinin miktarları 0.27-1.40 mg/g arasında belirlenmiş olup, en düşük κ-kazein miktarı daha önce de bahsedildiği gibi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Peynirde α_s- ve β-kazeine kıyasla κ-kazeinin çok düşük miktarlarda bulunduğu Wedholm ve ark. (2006) tarafından da bildirilmiştir.

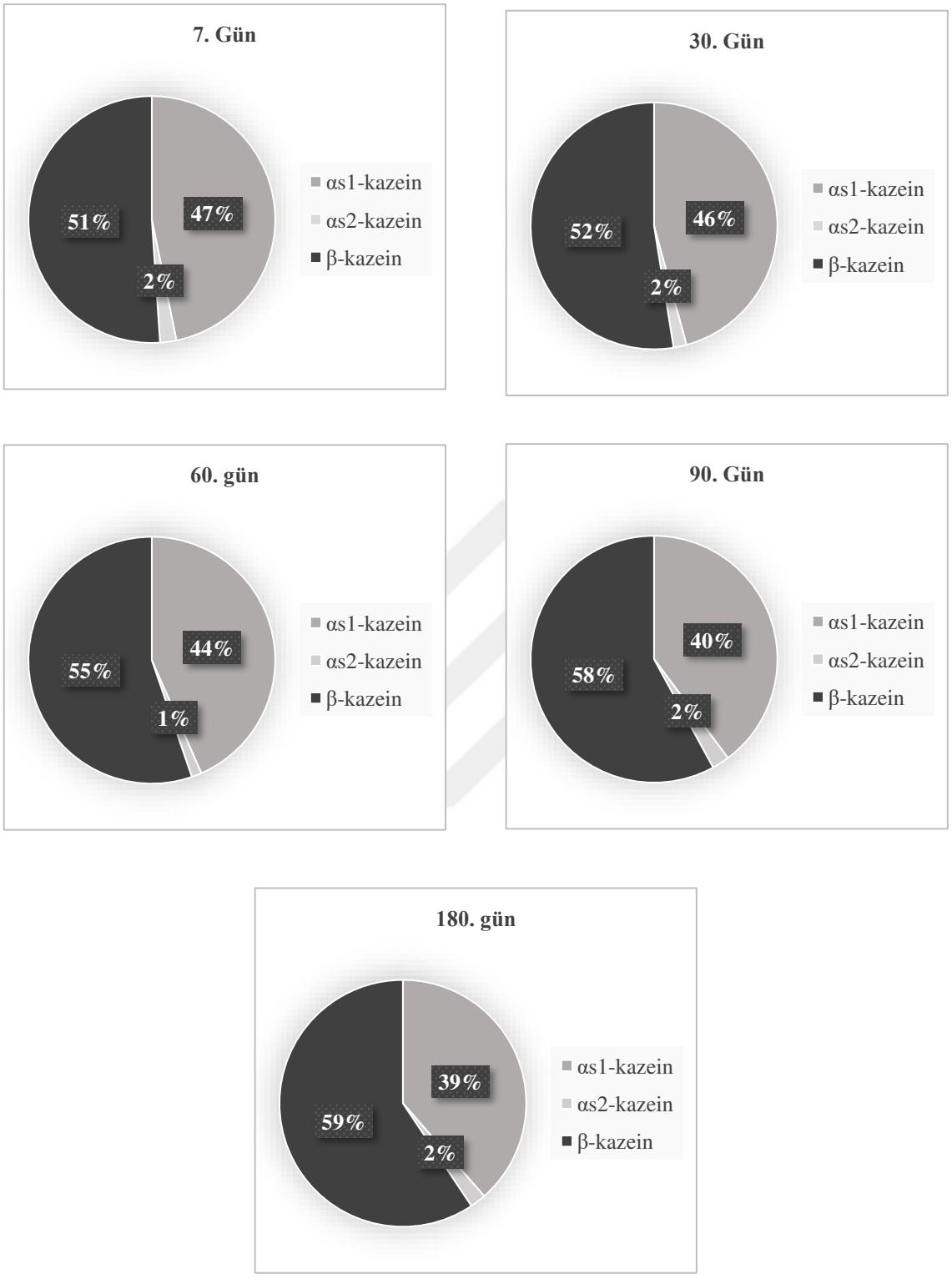
4.3. Olgunlaşma Süresi Boyunca Peptid Dinamiği Sonuçları ve Tartışma

4.3.1. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri

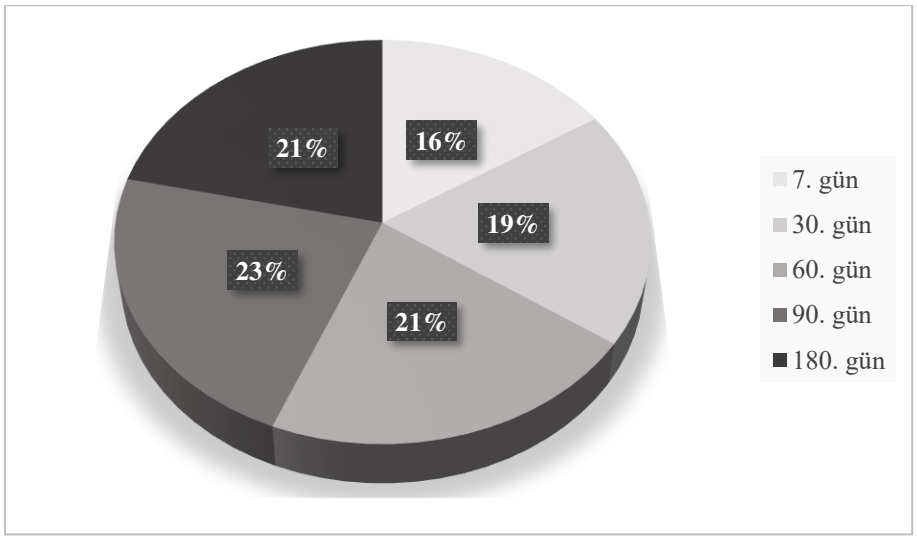
Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresince peptid dinamiğinde meydana gelen değişimi gözlemlemek amacıyla Şekil 4.15. düzenlenmiştir. Olgunlaşma süresine bağlı olarak α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein türevli peptidlerin oluşum oranları değerlendirilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca κ-kazein türevli peptid oluşumu belirlenmemiştir. κ-kazeinin rennet ile parçalanması sonucu peynirde kalan *para*-κ-kazeinin hidrolize karşı çok dirençli olduğu bildirilmiştir ve κ-kazeinden meydana gelen peptidlere peynirlerin olgunlaşması sırasında birçok çalışmada da rastlanmamıştır (Rizzello ve ark., 2005; Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Şekil 4.15. incelendiğinde, tulum peynirine β-kazein türevli peptidlerin hakim olduğu görülmüş olup, olgunlaşma süresinin ilerlemesiyle birlikte tulum peynirinde β-kazein türevli peptidlerin oranı artarken α_{s1}-kazein türevli peptid oranın ise azaldığı tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca α_{s1}- ve β-kazein türevli

peptidlerin oranı zıt bir seyir izlemiştir. Olgunlaşma süresince α_{s1}-kazein türevli peptid sayısı artmasına rağmen, daha yüksek oranda β-kazein türevli peptidlerin meydana gelmesi oransal olarak α_{s1}-kazein türevli peptidlerde azalışa neden olmuştur. Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde, Fontenele ve ark. (2017) da Coalho peynirinde β-kazein türevli peptidlerin hakim olduğunu belirlemişlerdir. Demirci (2019) Anamur yöresinde üretilen tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında *L. plantarum* ve *E. faecium* suşlarının hakim olduğunu belirlerken, 180 günlük olgunlaşma süresinin sonlarına doğru *E. faecium* suşlarının tulum peynirlerinin mikrobiyotasında baskın olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmanın sonucuna dayanarak, Anamur yöresine ait tulum peynirlerindeki *E. faecium*'a ait proteolitik enzimlerin β-kazein üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Quirós ve ark. (2009) *E. faecalis* ile fermente edilen sütlerde simüle edilmiş fizyolojik sindirim koşullarında β-kazein türevli 7 peptidin parçalandığını bildirmişlerdir.

α_{s2}-kazein türevli peptidlerin diğer peptidlere kıyasla çok az oranda tulum peynirinde bulunduğu, olgunlaşma süresine bağlı olarak α_{s2}-kazein türevli peptid oranının neredeyse sabit kaldığı tespit edilmiştir. Sousa ve ark. (2001) da peynir olgunlaşması sırasında α_{s2}-kazein türevli az sayıda peptidin meydana geldiğini bildirmişlerdir. McSweeney ve ark. (1994) tarafından α_{s2}-kazeinin kimozin enzimine karşı α_{s1}-kazeinden daha dayanıklı olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Bhat ve ark. (2016) α_{s2}-kazeindeki disülfit bağlarının proteolitik enzimlere karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla α_{s2}-kazein türevli peptid oranının olgunlaşma süresince benzer kalması şaşırtıcı değildir. Bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak, İsviçre tipi peynirlerde Sadat-Mekmene ve ark. (2013) en çok β-kazein türevli peptidler belirlemiş olup bunu sırasıyla α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptidler takip etmiştir.



Şekil 4.15. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinden peptid dinamiğinin olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.



Şekil 4.16. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen fonksiyonel peptid sayısının olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, olgunlaşma süresinin ilerlemesiyle fonksiyonel peptid sayısında da artış belirlenmiştir. Meydana gelen peptid sayısındaki artışa paralel olarak biyolojik olarak aktif peptidlerin de sayısı artmıştır. Yani tulum peynirinin olgunlaşması ile fonksiyonel özellikli peptidler, biyoaktif peptidler, meydana gelmektedir. Olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra gözlemlenen nispi azalış fonksiyonel peptidlerin ileri derecede hidrolize olmasıyla yeni peptidlerin meydana gelmesinden kaynaklanmış olabilir. Biyoaktif özellik gösteren peptidlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β-kazein türevli olduğu belirlenmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen peptidlerin çeşidine bağlı olarak genel olarak ACE inhibitörü, antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik, GLP-1 artırıcı, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, beyin fonksiyonunu artırıcı ve kolesterol düzenleyici özelliklerden oluşan 9 farklı biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu peptidler arasında, ACE inhibitörü peptidlerin sayısı daha fazla bulunmuştur. Benzer şekilde, Pisanu ve ark. (2015) çiğ koyun sütünden üretilen peynirlerde ACE inhibitörü peptidlerin daha yüksek sayıda olduğunu bildirmişlerdir. Biyolojik olarak aktif peptidler yaklaşık benzer oranlarda α_{s1}- ve β-kazein türevli peptidlerden meydana gelmiştir. Ancak, α_{s2}-kazein türevli fonksiyonel peptid belirlenememiştir. Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde mineral taşıyıcı, ACE inhibitörü ve immünomodülatör peptidler tespit etmişlerdir. Pisanu ve ark. (2015) çiğ koyun sütü kullanılarak üretilen peynirlerin 9 ay olgunlaştırılmasından sonra immünomodülatör, ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, antikarsinojenik ve opioid peptidlerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmalara ek olarak,

Fontenele ve ark. (2017) geleneksel Coalho peynirinde antimikrobiyal, ACE inhibitörü ve immünomodülatör peptidler belirlemişlerdir. Tüm bu çalışmalarla kıyaslandığında, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin çok daha çeşitli biyoaktif peptidlerin kaynağı olduğu görülmektedir.

4.3.1.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.16.'da sunulmaktadır. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 45 adet α_{s1}-KN türevli peptid belirlenmiştir. Genel olarak peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (33 adet) α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği tespit edilmiştir. Daha sonrasında, α_{s1}-KN'in orta kısmından 11 adet ve α_{s1}-KN'in C terminal bölgesinden 1 adet α_{s1}-KN türevli peptidlerin bulunduğu gözlemlenmiştir. Fontenele ve ark. (2017) Coalho peynirlerinin sulu ekstraktlarındaki peptidlerin büyük bir çoğunluğunun α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Sagardia ve ark. (2013) çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin büyük bir çoğunluğunun α_{s1}-KN'in N terminal ve orta bölgelerinden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Peynir üzerinde gerçekleştirilen çoğu çalışmada peptidlerin genellikle α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir.

Sommerer ve ark. (2001) tarafından 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında α_{s1}-KN türevli 17 peptid, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 50 peptid, Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 34 peptid, Pisanu ve ark. (2015) çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerin 9 ay olgunlaştırılmasından sonra 62 adet α_{s1}-KN türevli peptid ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde 50 adet α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu farklılıkların üretimde kullanılan süt türü ve ısıl işlem gibi üretim metodundaki farklılıklardan ve peynirlerin mikrobiyotasındaki farklılıklardan meydana geldiği düşünülmektedir. Losito ve ark. (2006) İtalyan peynirlerinde farklı sütlerin (koyun, keçi ve inek) kullanılması ile suda çözünebilir ekstraktlarda farklı peptidlerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Gómez-Ruiz ve ark. (2004) pastörize süt kullanılarak üretilen peynirlerde çiğ sütten üretilenlere kıyasla peptid miktarının azaldığını

bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Pisanu ve ark. (2015) pastörizasyon işlemi uygulanan koyun sütlerinden üretilen ve 9 ay olgunlaştırılan peynirlerde çiğ sütten üretilenlere kıyasla peptid miktarının az olduğunu bildirmişlerdir. İlgili araştırmacılar, bu durumun ısıl işlemin peynirdeki proteinlerin proteolitik enzimlere karşı duyarlılıklarını etkilemesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca, C terminal bölgesinden belirlenen α_{s1}-KN (186-212) dışında, gözlemlenen α_{s1}-KN türevli peptidlerin 5-14 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyoaktif peptidlerin de 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda bu peptidlerin biyoaktif olma potansiyeli çok yüksektir (Hartmann ve Meisel, 2007). Genellikle belirlenen peptidler arasında hekzapeptidlerin baskın olduğu ve bunu sırasıyla heptapeptidlerin ve oktapeptidlerin takip ettiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma bulgularına benzer şekilde, Sagardia ve ark. (2013) 4 ay olgunlaştırılan Idizabal peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli peptidlerin 6-17 amino asit uzunluğuna sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Genellikle peynirlerde, α_{s1}-KN'in proteolitik enzimlerle hidrolizi sonucunda israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana geldiği birçok çalışmada bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009; Pisanu ve ark., 2015; Georgalaki ve ark., 2017). İsrasidin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinde bulunan ve 23 amino asit uzunluğuna sahip antimikrobiyal bir peptiddir (Pisanu ve ark., 2015). İsrasidin peptidinin içerdiği amino asitlerden bazıları koyun, keçi ve inek sütlerinde farlılık göstermektedir ve dolayısıyla israsidin peptidinin dizilimi süt çeşidine göre değişmektedir (Sforza ve ark., 2011). İnek sütünde israsidin peptidi RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden, koyun sütünde israsidin peptidi RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden ve keçi sütünde israsidin peptidi RPKHPINHQGLSPEVPNENLLRF amino asit dizilimlerinden oluşmaktadır. Bu peptid, peynirde gerçekleşen primer proteoliz süresince kimozin ile α_{s1}-KN'in parçalanmasından meydana gelmektedir (Lahov ve Regelson, 1996). Ayrıca, ilerleyen olgunlaşma günlerinde israsidin ileri derece proteoliz olmaktadır. Saito ve ark. (2000) Gouda peynirlerinde israsidinin hidrolizi sonucu RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Fontenele ve ark. (2017) de Coalho peynirinde israsidinin C terminal bölgesinin hidrolize olmasıyla EVLNENLLR, NENLLRF, EVLNENLLRF ve VLNENLLRF peptidlerini belirlemişlerdir.

Çizelge 4.16. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	2.478	1125.6158	α_{s1}-KN (16-24)	Caprine	RPKHPINHQ	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
2	2.480	1182.6351	α_{s1}-KN (16-25)	Caprine	RPKHPINHQG	-	-		*	*	*	*
3	2.554	929.4826	α_{s1}-KN (18-25)	Caprine	KHPINHQG	-	-					*
4	2.554	872.4608	α_{s1}-KN (18-24)	Caprine	KHPINHQ	-	-					*
5	3.620	1355.6939	α_{s1}-KN (18-29)	Caprine	KHPINHQGLSPE	-	-	*	*	*	*	*
6	3.698	1355.6938	α_{s1}-KN (19-29)	Caprine	HPINHQGLSPE	-	-			*		
7	4.077	584.3528	α_{s1}-KN (125-129)	Ovine	EIVPK	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)				*	*
8	4.154	858.4453	α_{s1}-KN (49-55)	Caprine	KENINEL	-	-					*
9	4.230	988.5709	α_{s1}-KN (116-123)	Caprine	KKYNVPQL	ACE inhibitörü	Ruiz ve ark. (2004)		*	*	*	*
10	4.687	811.4072	α_{s1}-KN (25-32)	Caprine	GLSPEVPN	-	-	*	*	*	*	*
11	10.249	1608.8410	α_{s1}-KN (16-29)	Caprine	RPKHPINHQGLSPE	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
12	18.020	700.3730	α_{s1}-KN (30-35)	Bovine	VLNENL	ACE inhibitörü	Benavente ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
13	18.401	730.3479	α_{s1}-KN (50-55)	Caprine	ENINEL	-	-				*	*
14	19.090	1370.8450	α_{s1}-KN (113-123)	Caprine	LRLKKYNVPQL	-	-				*	
15	19.239	977.4801	α_{s1}-KN (100-107)	Bovine	DVPSERYL	-	-					*
16	19.391	721.3648	α_{s1}-KN (107-112)	Bovine	LGYLEQ	-	-				*	*
17	19.620	569.3160	α_{s1}-KN (119-123)	Caprine	NVPQL	-	-			*	*	*
18	20.077	969.5577	α_{s1}-KN (30-37)	Bovine	VLNENLLR	Antibakteriyal	Hayes ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
19	20.763	658.3326	α_{s1}-KN (40-45)	Bovine	VAPFPE	-	-	*	*	*	*	*
20	21.751	664.3427	α_{s1}-KN (109-113)	Bovine	YLEQL	-	-			*		
21	23.506	714.3940	α_{s1}-KN (31-36)	Bovine	LNENLL	-	-			*	*	*
22	23.658	732.3811	α_{s1}-KN (118-123)	Caprine	YNVPQL	-	-			*	*	*
23	24.039	713.3949	α_{s1}-KN (25-31)	Ovine	GLSPEVL	-	-		*	*	*	*
24	24.113	721.3642	α_{s1}-KN (186-212)	Bovine	TQYTDAPSFSDIPNPIGSEN SEKTTMP	-	-	*				
25	24.116	721.3664	α_{s1}-KN (108-113)	Bovine	GYLEQL	-	-	*	*	*	*	*
26	24.341	1287.7354	α_{s1}-KN (39-49)	Caprine	VVAPFPEVFRK	-	-	*				
27	24.346	661.3898	α_{s1}-KN (34-38)	Bovine	NLLRF	ACE inhibitörü ve antioksidan, antikarsinojenik	Hernández-Ledesma ve ark. (2005); Sah ve ark. (2015)				*	
28	24.496	628.3574	α_{s1}-KN (39-44)	Caprine	VVAPFP	-	-	*	*	*	*	*
29	24.875	813.4579	α_{s1}-KN (30-36)	Bovine	VLNENLL	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
30	24.953	904.4776	α_{s1}-KN (32-38)	Bovine	NENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*

31	25.182	790.4304	α_{s1}-KN (33-38)	Bovine	ENLLRF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
32	25.486	1060.5743	α_{s1}-KN (37-45)	Caprine	RFVVAPFPE	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
33	25.944	757.4001	α_{s1}-KN (40-46)	Bovine	VAPFPEV	DPP-4 inhibitörü	Boots (2009)		*	*	*	*
34	26.248	805.3983	α_{s1}-KN (39-45)	Bovine	FVAPFPE	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)		*	*	*	*
35	26.324	805.3997	α_{s1}-KN (39-45)	Caprine	VVAPFPE	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)	*	*	*	*	*
36	26.706	1017.5614	α_{s1}-KN (31-38)	Bovine	LNENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
37	27.163	834.4472	α_{s1}-KN (107-113)	Bovine	LGYLEQL	-	-		*	*	*	*
38	27.315	856.4667	α_{s1}-KN (39-46)	Caprine	VVAPFPEV	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
39	27.617	1116.6333	α_{s1}-KN (30-38)	Bovine	VLNENLLRF	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
40	27.772	1159.6399	α_{s1}-KN (39-48)	Caprine	VVAPFPEVFR	-	-	*	*	*	*	*
41	28.077	904.4703	α_{s1}-KN (38-45)	Caprine	FVVAPFPE	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
42	30.134	1680.8423	α_{s1}-KN (100-113)	Bovine	DVPSERYLGYLEQL	-	-	*	*	*	*	*
43	31.354	904.4690	α_{s1}-KN (40-47)	Bovine	VAPFPEVF	ACE inhibitörü	del Mar Contreras ve ark. (2013)			*		
44	32.267	1003.5362	α_{s1}-KN (39-47)	Caprine	VVAPFPEVF	ACE inhibitörü	Espejo-Carpio ve ark. (2013)			*	*	*
45	35.697	1150.6082	α_{s1}-KN (38-47)	Caprine	FVVAPFPEVF	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)		*			
Toplam								**22**	**27**	**33**	**35**	**37**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_851372, NP_001272624, NP_001009795). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı: glukagon benzeri peptid-1 sekresyonunu artırarak insülin salımını artırmakta ve iştahı azaltmaktadır, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Anamur yöresinde tespit edilen α_{s1}-KN'lerden 7 tanesinin, α_{s1}-KN (16-24), α_{s1}-KN (16-25), α_{s1}-KN (16-29), α_{s1}-KN (18-24), α_{s1}-KN (18-25), α_{s1}-KN (18-29) ve α_{s1}-KN (19-29), israsidinin N terminalinden bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, 2 peptidin, α_{s1}-KN (25-31) ve α_{s1}-KN (25-32), israsidinin orta bölgesinden ve 9 peptidin, α_{s1}-KN (30-35), α_{s1}-KN (30-36), α_{s1}-KN (30-37), α_{s1}-KN (30-38), α_{s1}-KN (31-36), α_{s1}-KN (31-38), α_{s1}-KN (32-38), α_{s1}-KN (33-38) ve α_{s1}-KN (34-38), israsidinin C terminalinden bölgesinden oluştuğu belirlenmiştir. İsrasidinin N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden meydana gelen peptidlerin çoğunlukla karboksipeptidaz aktivitesinden kaynaklandığı görülmektedir. Bu durumda, karboksipeptidazların israsidin üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Georgalaki ve ark. (2017) *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* ile 24 saat fermente edilen inek sütlerinde yoğun olarak israsidinin N terminal bölgesinden meydana gelen peptidleri tespit etmişlerdir.

α_{s1}-KN'de israsidin peptidini takip eden bölgeden 15 adet peptidin, αs1-KN (37-45), α_{s1}-KN (38-45), α_{s1}-KN (38-47), α_{s1}-KN (39-44), α_{s1}-KN (39-45/bovine), α_{s1}-KN (39-45/caprine), α_{s1}-KN (39-46), α_{s1}-KN (39-47), α_{s1}-KN (39-48), α_{s1}-KN (39-49), α_{s1}-KN (40-45), α_{s1}-KN (40-46), α_{s1}-KN (40-47), α_{s1}-KN (49-55) ve α_{s1}-KN (49-55), meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, α_{s1}-KN'nin orta bölgesinden de parçalanmalar olduğu ve 10 adet peptidin, α_{s1}-KN (100-107), α_{s1}-KN (100-113), α_{s1}-KN (107-112), α_{s1}-KN (107-113), α_{s1}-KN (108-113), α_{s1}-KN (109-113), α_{s1}-KN (113-123), α_{s1}-KN (116-123), α_{s1}-KN (118-123) ve α_{s1}-KN (119-123), oluştuğu tespit edilmiştir. Burada, çoğunlukla aminopeptidaz aktivitesine bağlı olarak bu peptidlerin meydana geldiği görülmektedir. α_{s1}-KN'nin orta bölgesinden meydana gelen peptidlerin korunmuş iki sekans taşıdığı gözlemlenmiştir. Bu sekansların α_{s1}-KN (109-113) olan YLEQL ve α_{s1}-KN (119-123) olan NVPQL dizilerinden oluştuğu belirlenmiştir.

Georgalaki ve ark. (2017) *S. thermophilus*'un inek sütünde gelişimi sırasında israsidinin C terminal bölgesinden VLNENLLRF peptidinin, α_{s1}-KN (30-38), meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteazların aktivitesiyle koyun sütünde israsidinin C terminal bölgesinden NENLLR peptidinin meydana geldiği belirlemiş olup *Lc. lactis*'e ait proteazların özellikle C terminalindeki fenilalanin (F) ve lösin bağlarını (L) etkilediğini bildirmişlerdir. Gene aynı araştırmacılar, *Lc. lactis*'e ait proteazların koyun ve inek sütünde israsidin peptidini takip eden sıradaki FVVAPFP, FVVAPFPE, FVVAPFPEVF, VVAPFPE, VAPFPE, VAPFPEVF, VAPFPEVFG, APFPEVF ve FPEVF peptidleri meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Benzer peptid deseni bu çalışmada da gözlemlenmiştir. Demirci (2019) Anamur yöresine

ait tulum peynirlerinin mikrobiyotasında *Lc. lactis* suşlarını gözlemlemesi bu verilerle uyumluluk göstermektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca belirlenen α_{s1}-KN türevli peptid sayısında gerçekleşen proteolize bağlı olarak artış belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında 22 α_{s1}-KN türevli peptid belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise 37 α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularından farklı bir şekilde, Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaşma süresinin sonunda Ragusano peynirinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısının 34'ten 13'e düştüğünü bildirmişlerdir. Ragusano peynirinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin ileri derecede hidrolizi gerçekleşirken, Anamur yöresine ait tulum peynirinde ise bazı peptidler birikirken bazıları da hidrolize olarak yeni peptidler meydana gelmiştir. Bu farklılığın, üretim metoduna, kullanılan süte ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olarak proteolitik sisteminin çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidler ve peptid dinamiği bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Tüm olgunlaşma süresi boyunca 45 farklı çeşitte α_{s1}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Toplam 20 peptidin, RPKHPINHQ, KHPINHQGLSPE, GLSPEVPN, RPKHPINHQGLSPE, VLNENL, VLNENLLR, VAPFPE, GYLEQL, VVAPFP, VLNENLL, NENLLRF, ENLLRF, RFVVAPFPE, VVAPFPE, LNENLLRF, VVAPFPEV, VLNENLLRF, VVAPFPEVFR, FVVAPFPE ve DVPSERYLGYLEQL, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinde devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu korunmuş peptidlerden DVPSERYLGYLEQL dışındaki peptidlerin hepsinin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği ve çoğunlukla israsidin peptidinin parçalanma ürünleri oldukları görülmektedir. Olgunlaşma süresinin farklı aşamalarında bu peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de gözlemlenmiş olup, olgunlaşma süresince bu peptidlerin devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gagnaire ve ark. (2011) Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca RPKHPIKHQ, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, NENLLRF ve FVAPFPEVFGKEKV peptidlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar da genellikle israsidin kökenli peptidlerin kaldığını tespit etmişlerdir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, antikarsinojenik, GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve DPP-4 inhibitörü olmak üzere 6 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Genel itibariyle ACE inhibitörü peptid sayısının daha fazla olduğu

belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile ACE inhibitörü peptidlerin sayısında artış görülmüştür. Anamur yöresinde belirlenen α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptidler; RPKHPINHQ, EIVPK, KKYNVPQL, RPKHPINHQGLSPE, VLNENL, NLLRF, VLNENLL, ENLLRF, FVAPFPE, VVAPFPE, VLNENLLRF, FVVAPFPE, VAPFPEVF, VVAPFPEVF ve FVVAPFPEVF peptidlerinden oluşmaktadır. Saito ve ark. (2000) 8 ay olgunlaştırılan Gouda peynirlerinde yüksek ACE inhibitörü özellik gösteren RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerini tespit etmişlerdir. ACE inhibitörü biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Bu çalışmada belirlenen ACE inhibitörü peptidlerin çoğunda da (Q) fenilalanin (F), lösin (L), valin (V), arjinin (R) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmektedir. C terminal ucunda hidrofobik prolin amino asidi peptidlerin daha yüksek ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiği, fenilalanin bulunanların ise daha düşük oranda ACE inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006).

ACE inhibitörü, antioksidan ve antikarsinojenik özellikler gibi çok fonksiyonlu aktiviteye sahip olan NLLRF peptidi olgunlaşma süresinin 90. gününde belirlenmiştir. GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve dolasıyla insülin salımının artmasına bağlı olarak iştahı azaltan LNENLLRF ve NENLLRF tüm olgunlaşma günlerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin 30. gününden 180. gününe kadar tip II diyabeti üzerinde etkili DPP-4 inhibitörü özellik gösteren VAPFPEV peptidi görülmüştür. Ayrıca, antibakteriyal özelliklere sahip VLNENLLR, RFVVAPFPE ve VVAPFPEV peptidleri 180 gün boyunca tüm olgunlaşma günlerinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada, antioksidan özellik gösteren peptidlerin multifonksiyonel özellikli peptidler olduğu görülmüştür ve bunlar NLLRF, VLNENLL ve FVAPFPE peptidlerinden oluşmaktadır. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin (Y) amino asitlerini içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durum, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen antioksidan peptidlerin fenilalanin, prolin ve lösin gibi hidrofobik amino asitleri içermesi ile tutarlılık göstermektedir.

4.3.1.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.17.'de sunulmaktadır. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 2 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu peptidlerin, α_{s2}-KN'in C terminal bölgesinden ve orta bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) da 4 ve 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde α_{s2}-KN'in C terminal ve orta bölgesinden meydana gelen peptidler gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Fontenele ve ark. (2017) Coalho peynirinde meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin C terminal ve orta bölgelerden kaynaklandığını belirlemişlerdir. Genellikle, peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptidlerin bu bölgelerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Dalsgaard ve ark. (2008) ise plazmin aktivitesi ile çoğunlukla α_{s2}-KN'in C terminal ve orta bölgelerinden peptidlerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

α_{s2}-KN'in plazmin enziminin etkisine karşı çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996). Bununla birlikte, α_{s2}-KN'in α_{s1}-KN'e kıyasla kimozin enzimine karşı daha dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (McSweeney ve ark., 1994). Sütün doğal enzimi olan plazmin, α_{s2}-KN'de özellikle lizin amino asidi ile bağlı peptid bağlarına ek olarak daha az oranda arjinin amino asidi ile bağlı peptid bağlarının parçalanmasından sorumludur (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin aktivitesi ile sığır α_{s2}-KN türevli TVYQHQK, KISQRYQK, TVDMESTEVFTK, EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTK, AMKPWIQPK, KTKLTEEEKNRLNFLKK, KTKLTEEEKNR, FALPQYLK, TKVIPYVRYL ve LTEEEK peptidlerinin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Larsen ve ark. (1996) sütte doğal olarak bulunan diğer bir enzim olan katepsin D'nin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgelerinde bulunan bazı lösin ve tirozin bağlarına etki ettiğini bildirmişlerdir. *Lactobacillus casei* PRA205 ve *Lactobacillus rhamnosus* PRA331 suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}- ve β-KN'e kıyasla α_{s2}-KN'i çok az oranda hidrolize ettiği bildirilmiştir (Solieri ve ark., 2018). Broadbent ve ark. (2002) *Lc. lactis*'e ait hücre duvarı ilişkili proteinazın (laktosepin) Cheddar peynirinde α_{s2}-KN (f 1-21) peptidinin oluşumundan sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e hücre dışı proteinazların koyun sütünde α_{s2}-KN (7-16), α_{s2}-KN (82-89), α_{s2}-KN (93-97), α_{s2}-KN (168-174), α_{s2}-KN (175-180), α_{s2}-KN (199-204) peptidlerini ve inek sütünde ise yalnızca

α_{s2}-KN (107-111) peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Moreno-Montoro ve ark. (2018) ise *S. thermophilus, L. bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde α_{s2}-KN türevli IYKQEK, NMAIHPR, YQKFPQY, LQYPYQGPIVL, LKKISQ, LKKISQY, LKTVDQHQK, TVDQHQK, VDQHQK ve AMKPWTQPK peptidlerinin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Minervini ve ark. (2003) *L. helveticus*'a ait proteinazların koyun sütünde α_{s2}-KN'in C terminal bölgesinden TVDQ ve HQK peptidlerini ve keçi sütünde α_{s2}-KN'in gene C terminal bölgesinden TVDQHQ peptidini meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Dolayısıyla, sütün doğal enzimlerine ek olarak mikrobiyal proteolitik enzimlerin de α_{s2}-KN'in hidrolizinden sorumlu olduğu düşünebilir. Diğer taraftan, Chang ve ark. (2013) *Bifidobacterium longum*'a ait proteolitik enzimlerin α_{s2}-KN üzerinde etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, Veljovic ve ark. (2009) enterokoklara ait hücre dışı proteinazların α_{s2}-KN'in hidrolizinde rol almadığını bildirmişlerdir.

Fontenele ve ark. (2017) Coalho peynirinde YQKPIVLNPWDQVKR, YQKPIVLNPWDQVKRN, LYQKPIVLNPWDQVKR, AMKPWIOPK ve YQHOK, peptidlerinden oluşan 5 α_{s2}-KN türevli peptid tespit etmişlerdir. Ayrıca, Sommerer ve ark. (2001) 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 2, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 12 ve Sagardia ve ark. (2013) 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 11 α_{s2}-KN türevli peptid tanımlamışlardır. Peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, koagülant miktarına, koagülant çeşidine ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin 6 ve 8 amino asit uzunluğuna sahip olduğu görülmektedir. Coalho peynirlerinde 5-16 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidlerin olduğu (Fontenele ve ark., 2017), 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 10-13 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidlerin oluştuğu (Gagnaire ve ark., 2011) ve 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 4-11 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidlerin bulunduğu (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) tespit edilmiştir. Bu çalışmalara kıyasla, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde daha kısa zincirli α_{s2}-KN türevli peptidler meydana gelmiştir. Bu durum proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Çizelge 4.17. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [b]				
								7	30	60	90	180
1	19.010	763.3508	α_{s2}-KN (98-103)	Bovine	NEINQF	-	-				*	*
2	26.400	993.5627	α_{s2}-KN (216-223)	Caprine	AIPYVRYL	Antibakteriyal	Sanchez ve ark. (2013)	*	*	*	*	*
Toplam								**1**	**1**	**1**	**2**	**2**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_776953, NP_001272514, NP_001009363). KN: kazein.
[b] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Biyoaktif peptidlerin genellikle kısa zincirli (2-20 amino asit) peptidlerden oluştuğu bildirilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007). Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tüm olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan bir oktapeptid olan AIPYVRYL peptidinin de fonksiyonel özellik gösterdiği ve antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidin Gram pozitif bakterilere, özellikle *Staphylococcus* cinsine karşı yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite sergilediği bildirilmiştir (Sanchez ve ark., 2013). Ancak, bu araştırmacılar *Escherichia coli* ve *Serratia marcesens* gibi Gram negatif bakterilerin AIPYVRYL peptidinin etkisine karşı dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

Swaisgood (1992) α_{s2}-KN üzerinde 90-120 ve 160-207 bölgelerinden oluşan iki hidrofobik alanın bulunduğunu bildirmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde hidrofobik bölgeden α_{s2}-KN (98-103) peptidi ve hidrofilik bölgeden α_{s2}-KN (216-223) peptidi olmak üzere toplam 2 peptid tanımlanmıştır. Hidrofobik bölgedeki, NEINQF peptidinden hemen önce lösin amino asidi bulunmaktadır. Dolayısıyla, katepsin D'nin lösin bağı üzerindeki etkisine bağlı olarak bu peptid meydana gelmiş olabilir (Larsen ve ark., 1996). Ayrıca, peynirde kalan kimozin aktivitesine bağlı olarak da bu peptid meydana gelmiş olabilir. Çünkü, McSweeney ve ark. (1994) kimozin enziminin α_{s2}-KN üzerindeki aktivitesinin bu hidrofobik bölgelerle sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Hidrofilik bölgeden elde edilen AIPYVRYL peptidi ise muhtemelen mikrobiyal enzimlerin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir. Bu peptid, Pisanu ve ark. (2015) tarafından pastörize süt ve starter kültür kullanılarak üretilen koyun peynirlerde de belirlenmiştir.

Demirci (2019) 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde enterokok suşlarının baskın olarak bulunduğunu, bununla birlikte daha az oranda *Lactococcus* ve *L. plantarum* suşlarının da bulunduğunu bildirmiştir. Bu mikrobiyotaya ait enzimlerin Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptidlerin oluşumunda çok önemli bir paya sahip olmadığı düşünülmektedir. Ancak, olası mikrobiyal proteolitik aktivitenin *Lactococcus* veya *L. plantarum* suşlarına ait proteinaz enzimlerinden kaynaklandığı öngörülmektedir. Çünkü gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, enterokoklara ait hücre dışı proteinazların α_{s2}-KN'in hidrolizinde etkili olmadığı, *Lactococcus* suşlarına ait proteinazların α_{s2}-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden bazı peptidleri meydana getirdiği ve *L. plantarum* suşlarının keçi sütünde α_{s2}-KN türevli peptidlerin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Broadbent ve

ark., 2002; Veljovic ve ark., 2009; Bounouala ve ark., 2017; Moreno-Montoro ve ark., 2018).

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar 1 α_{s2}-KN türevli peptid ve olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde 2 α_{s2}-KN türevli peptid belirlenmiştir. Bu peptidlerden, AIPYVRYL peptidi tüm olgunlaşma günlerinde gözlemlenirken, NEINQF peptidi ise olgunlaşma süresinin 90. gününden itibaren görülmeye başlanmıştır. Benzer şekilde, Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde 2 α_{s2}-KN türevli peptid tanımlamışlardır. İlgili araştırmacılar, bu peptidlerden bir tanesin tüm olgunlaşma günlerinde (0, 4 ve 7 ay) bulunduğunu, diğerinin ise olgunlaşma süresinin sonunda meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Genel olarak, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca önemli bir artış belirlenmemiştir. Bu durum, α_{s2}-KN'in Anamur yöresine ait tulum peynirlerindeki proteolitik enzimlere karşı direncini göstermektedir. Bhat ve ark. (2016) α_{s2}-KN'indeki disülfit bağlarının proteolitik enzimlere karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Larsson ve ark. (2006) en yüksek aktiviteyi pH 6.0'da gösteren plazminin etkisinin peynirde pH'nın düşmesi ile azaldığını ve pH 5.0-5.2 aralığında ise sınırlı aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, asit proteinaz olan katepsin D optimum aktivitesini pH 4.0'te gösterdiği bildirilmiştir. (McSweeney ve ark., 1995). Dolayısıyla, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen pH değerlerinin 4.95-5.13 arasında değiştiği göz önünde bulundurulduğunda bu peynirlerde plazmin ve katepsin D aktivitesinin sınırlı olduğu düşünülmektedir.

4.3.1.3. β-kazein türevli peptidler

β-kazeinin kimozin ile parçalanmasının çok sınırlı olduğu ve plazmin etkisine bağlı olarak peynirlerde yüksek oranda parçalandığı bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017; Taivosalo ve ark., 2018). Plazmin enziminin özellikle lizin amino asidi (K) ve daha sonra arjinin amino asidi (R) bulunan bağlarda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin aktivitesi sonucunda çoğunlukla uzun amino asit zincirlerinden oluşan β-kazein türevli peptidler gözlemlemişlerdir. β-kazeinin, diğer kazeinlere kıyasla çok daha hidrofobik olması nedeniyle moleküler arası hidrofobik interaksiyonların kimozine hassas bağların kimozin tarafından erişimini engelleyebileceği bildirilmiştir (Fox ve ark., 2017).

Çizelge 4.18. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	3.545	856.4997	β-KN (109-116)	Ovine	GVPKVKET	-	-	*				
2	3.773	755.4527	β-KN (109-115)	Ovine	GVPKVKE	ACE inhibitörü	Papadimitriou ve ark. (2007)		*	*	*	*
3	4.230	755.3975	β-KN (62-67)	Ovine	DKIHPF	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)	*	*	*	*	*
4	4.230	574.2749	β-KN (172-176)	Ovine	FPPQS	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)			*	*	*
5	4.459	646.2818	β-KN (17-21)	Ovine	EQEEL	-	-		*	*	*	*
6	5.218	602.2767	β-KN (197-201)	Ovine	DMPIQ	Antioksidan	Di Pierro ve ark. (2014)			*		
7	18.325	651.3950	β-KN (185-190)	Ovine	VLPVPQ	-	-				*	*
8	19.468	744.3777	β-KN (77-83)	Ovine	FTGPIPN	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)		*	*	*	*
9	19.772	1125.5785	β-KN (59-67)	Ovine	ELQDKIHPF	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
10	19.926	1725.8339	β-KN (58-72)	Ovine	DELQDKIHPFAQAQS	-	-	*	*			
11	20.459	1629.7837	β-KN (16-29)	Ovine	REQEELNVVGETVE	-	-	*				
12	20.534	1204.7171	β-KN (180-190)	Ovine	LSQPKVLPVPQ	-	-		*	*	*	*
13	20.537	1439.7027	β-KN (58-69)	Ovine	DELQDKIHPFAQ	-	-		*	*	*	
14	20.915	1291.7472	β-KN (179-190)	Ovine	SLSQPKVLPVPQ	-	-	*	*	*	*	*
15	21.372	577.3098	β-KN (72-76)	Ovine	SLVYP	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)		*	*	*	*
16	21.448	841.4327	β-KN (76-83)	Ovine	PFTGPIPN	-	-		*	*	*	*
17	21.677	1240.6083	β-KN (58-67)	Ovine	DELQDKIHPF	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*	*	*
18	22.058	587.2948	β-KN (130-134)	Ovine	PVEPF	-	-	*	*	*	*	*
19	23.049	976.4803	β-KN (196-203)	Ovine	RDMPIQAF	ACE inhibitörü	Yamamoto ve ark. (1994)	*				
20	23.277	816.5231	β-KN (147-153)	Ovine	KLHLPLP	-	-					*
21	23.277	1163.6932	β-KN (179-189)	Ovine	SLSQPKVLPVP	-	-					*
22	23.736	1404.8319	β-KN (178-190)	Ovine	LSLSQPKVLPVPQ	-	-			*	*	
23	23.812	1380.7036	β-KN (76-88)	Ovine	PFTGPIPNSLPQN	-	-				*	
24	24.344	1037.6025	β-KN (210-219)	Ovine	VLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006); Quirós ve ark. (2007)		*	*	*	*
25	25.334	2017.9802	β-KN (159-176)	Caprine	MHQPPQPLSPTVMFPPQS	-	-				*	*
26	25.410	1536.8676	β-KN (204-217)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGP	-	-					*

27	26.022	1391.7512	β-KN (207-219)	Ovine	QEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)		*	*	*		
28	26.172	688.4265	β-KN (148-153)	Ovine	LHLPLP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007)		*	*	*	*	
29	26.325	2198.1030	β-KN (58-76)	Ovine	DELQDKIHPFAQAQSLVY P	-	-	*					
30	26.782	1554.8198	β-KN (209-219)	Ovine	PVLGPVRGPFP	-	-						*
31	26.934	1554.8136	β-KN (206-219)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFP	-	-	*	*	*	*	*	*
32	27.010	1156.7341	β-KN (147-156)	Ovine	KLHLPLPLVQ	-	-		*	*	*	*	*
33	27.162	1103.5624	β-KN (74-83)	Ovine	VYPFTGPIPN	-	-						*
34	28.000	696.4179	β-KN (87-92)	Ovine	QNILPL	-	-					*	*
35	28.153	1150.6888	β-KN (210-220)	Ovine	VLGPVRGPFPI	-	-		*	*	*	*	*
36	28.458	568.3584	β-KN (88-92)	Ovine	NILPL	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)					*	*
37	28.991	1479.7114	β-KN (123-134)	Ovine	EMPFPKYPVEPF	-	-					*	*
38	28.992	1089.5647	β-KN (196-204)	Ovine	RDMPIQAFL	Antibakteriyal	Rana ve ark. (2018)	*					
39	29.143	1504.8414	β-KN (207-220)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*	*
40	29.219	637.3467	β-KN (73-77)	Ovine	LVYPF	-	-				*	*	*
41	29.449	1376.7807	β-KN (208-220)	Ovine	EPVLGPVRGPFPI	İmmünomodülatör	Kruzel (2011)	*					
42	29.524	1755.9242	β-KN (73-88)	Ovine	LVYPFTGPIPNSLPQN	-	-				*	*	*
43	29.601	1780.9876	β-KN (204-219)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*	*
44	29.602	1028.6390	β-KN (148-156)	Ovine	LHLPLPLVQ	-	-				*	*	*
45	29.677	551.3678	β-KN (150-154)	Ovine	LPLPL	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)						*
46	29.752	724.3807	β-KN (72-77)	Ovine	SLVYPF	-	-		*	*	*	*	*
47	29.905	1667.9040	β-KN (206-220)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPI	Antibakteriyal	Birkemo ve ark. (2009)	*	*	*	*	*	*
48	29.982	996.6119	β-KN (214-222)	Ovine	VRGPFPILV	-	-					*	*
49	30.137	2633.4578	β-KN (93-116)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVP KVKET	-	-					*	
50	30.439	2403.3591	β-KN (93-114)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVP KVK	-	-				*	*	*
51	30.516	1429.8421	β-KN (147-158)	Ovine	KLHLPLPLVQSW	-	-	*					
52	30.589	1188.6625	β-KN (149-158)	Ovine	HLPLPLVQSW	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*					
53	30.743	1550.8341	β-KN (93-106)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPE	Antioksidan	Farvin ve ark. (2010)	*	*	*	*	*	*
54	30.743	1164.7026	β-KN (211-221)	Ovine	LGPVRGPFPIL	-	-						*
55	31.200	1263.7677	β-KN (210-221)	Ovine	VLGPVRGPFPIL	-	-		*	*	*	*	*
56	31.352	587.3665	β-KN (218-222)	Ovine	FPILV	-	-						*
57	31.503	1421.7970	β-KN (93-105)	Ovine	TQTPVVVPPFLQP	-	-				*	*	*

58	31.581	1663.9204	β-KN (92-106)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici, antiamnezik	Ohsawa ve ark. (2013)						*
59	31.809	1617.9226	β-KN (207-221)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*
60	32.114	1894.0722	β-KN (204-220)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPI	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
61	32.267	1362.8391	β-KN (210-222)	Ovine	VLGPVRGPFPILV	-	-					*
62	32.343	1780.9921	β-KN (206-221)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPIL	Hiperkolesterolemi önleyici, antioksidan	Mahdi ve ark. (2017); Mahdi ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
63	32.877	1716.9900	β-KN (207-222)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPILV	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)		*	*	*	*
64	33.333	1880.0620	β-KN (206-222)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPILV	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
65	34.324	1519.9095	β-KN (89-102)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPF	-	-				*	*
66	34.400	2007.1641	β-KN (204-221)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPIL	-	-				*	*
67	34.553	2201.2389	β-KN (140-158)	Ovine	LTLTDVEKLHLPLPLVQSW	-	-			*	*	*
68	34.628	1794.9630	β-KN (93-108)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIM	ACE inhibitörü	Pisanu ve ark. (2015)	*	*	*	*	*
69	34.781	1693.9142	β-KN (94-108)	Ovine	QTPVVVPPFLQPEIM	-	**-**					*
70	35.162	1987.1458	β-KN (89-106)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPE	-	-				*	*
71	35.312	2106.2279	β-KN (204-222)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPILV	İmmünomodülatör	Bonomi ve ark. (2011)			*		
72	36.762	1632.9881	β-KN (89-103)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFL	-	-			*	*	*
73	36.914	2231.2715	β-KN (89-108)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEIM	-	-		*	*	*	*
Toplam								**24**	**32**	**42**	**51**	**57**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: XP_010804480, XP_005681778, CAA34502). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, İmmünnomodülatör: bağışıklık sistemini düzenleyici, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, Antiamnezik: unutkanlık önleyici, Hiperkolesterolomi önleyici: kolesterol düşürücü.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Møller ve ark. (2012) sığır kimozinin β-kazeini sınırlı ölçüde hidrolize ettiğini ve C terminal bölgesinde bulunan Leu (L)-Ser (S), Gln (Q)-Ser (S), Ala (A)-Phe (F) ve Leu (L)-Tyr (Y) bağlarını parçaladığını tespit etmişlerdir. Ancak, bu araştırmacılar tarafından belirlenen β-kazein türevli peptidler Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmemiştir. Ayrıca, sütün doğal enzimi olan katepsin D'nin de β-kazeini hidrolize ettiği rapor edilmiştir (Hurley ve ark., 2000). Larsen ve ark. (1996) katepsin D enziminin β-kazeini 13 farklı bölgeden kestiğini ve bu bölgelerin çoğunlukla β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan lösin (L), fenilalanin (F), triptofan (W) ve serin (S) amino asitlerine ait bağlardan oluştuğunu bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak, peynirlerin olgunlaşma süresince mikrobiyal proteolitik enzimler de β-kazeinin ileri derecede hidrolizinde görev alabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2013; Bounouala ve ark., 2017; Solieri ve ark., 2018). Kazeinlerin parçalanmasında rol alan mikrobiyal proteolitik enzimler proteinazlardan ve peptidazlardan oluşmaktadır. Peynirde koagülant veya plazmin aktivitesi ile meydana gelen uzun veya orta büyüklükteki peptidler mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalanırken, oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996; Ardö ve ark., 2017).

Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.18.'de sunulmaktadır. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 73 çeşit β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Diğer yörelere ait tulum peynirlerine kıyasla, en az β-KN türevli peptid çeşidi Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. β-KN türevli peptid sayısındaki bu farklılığın tulum peyniri üretiminde kullanılan süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi, koagülant miktarı, aktif peynir mikrobiyotası ve üretim metodu ile ilgili farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Koagülant olarak fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) enzim, starter kültür olarak termofilik laktik asit bakterileri (streptokok ve laktobasil) ve ikincil starter olarak propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 28 çeşit (Gagnaire ve ark., 2001), rennet ve starter kültür olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) suşları kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra 17 çeşit (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), pıhtısı haşlanan bir peynir çeşidi olan Ragusano peynirinin 4 ay olgunlaştırılmasından sonra 20 çeşit

(Gagnaire ve ark., 2011), çiğ koyun sütünden üretilen Idiazabal peynirlerinin 4 ay olgunlaştırılmasından sonra 65 çeşit (Sagardia ve ark., 2013) ve kimozin kullanılarak çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde 74 çeşit (Fontenele ve ark., 2017) β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin 6 ay olgunlaşma süresince belirlenen β-KN türevli peptid sayısı Emmental, Manchego, Ragusano ve Idiazabal peynirlerinde belirlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Coalho peynirinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısı Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısına oldukça yakındır. Peynir üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda β-KN türevli peptid sayısında veya çeşidinde gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem uygulanıp uygulanmamasına, koagülant miktarına ve çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Çeşitli İtalyan peynirlerinin üretiminde farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda farklı β-KN türevli peptidlerin meydana geldiği gözlemlemiştir (Losito ve ark., 2006). Ayrıca, Pisanu ve ark. (2015) çiğ sütten üretilen peynirlerde pastörize süt kullanılarak üretilen peynirlere kıyasla daha fazla β-KN türevli peptidin bulunduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFP, PVLGPVRGPFP ve QEPVLGPVRGPFPI peptidleri Ragusano peynirinde de tanımlanmıştır (Gagnaire ve ark., 2011). Ayrıca, Coalho peynirinde gözlemlenen β-KN türevli ELQDKIHPF, YQEPVLGPVRGPFP, LLYQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPI ve EMPFPKYPVEPF peptidleri Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de tespit edilmiştir (Fontenele ve ark., 2017). Bununla birlikte, 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde belirlenen DKIHPF, SLSQPKVLPVPQ, LPLPL ve VLGPVRGPFP peptidlerine de Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır (Gómez-Ruiz ve ark., 2004). Canestrato Pugliese peynirinde belirlenen ELQDKIHPF peptidi (Losito ve ark., 2006) ve 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirinde belirlenen DMPIQ peptidi (Sommerer ve ark., 2001) de Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Diğer taraftan, peynir üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar arasında Anamur yöresine ait tulum peynirleri ile en fazla ortak β-KN türevli peptidler (20 adet) Idiazabal peynirinde belirlenmiştir (Sagardia ve

ark., 2013). Bu ortak peptidler; LYQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, PVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPILV, VLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, VRGPFPILV, LGPVRGPFPIL, SLSQPKVLPVPQ, LSQPKVLPVPQ ve PFTGPIPN peptidlerinden oluşmaktadır. Ancak, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan diğer β-KN türevli peptidler (meydana gelen peptidlerin büyük bir çoğunluğu) bu peynirlerde tanımlanan peptidlerden farklılık göstermektedir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde, peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (40) β-KN'in oldukça hidrofobik olan C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği ve miktar bakımından bu peptidleri β-KN'in N terminal (17) ve orta (16) bölgelerinden gelen peptidlerin takip ettiği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, α_{s2}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden oluştuğu belirlenmiştir. β-KN'in N terminal bölgesinin mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Miclo ve ark., 2012; Chang ve ark., 2013). β-KN türevli peptidlerin farklı peynirlerde farklı parçalanma bölgelerinden meydana geldiği görülmüştür. Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011), Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2007), Emmental (Gagnaire ve ark., 2001) ve Old Saare (Taivosalo ve ark., 2018) peynirlerinde β-KN'in orta ve C terminal bölgelerine kıyasla N terminal bölgesinden daha yüksek sayıda β-KN türevli peptid meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca, Coalho (Fontenele ve ark., 2017) ve keçi peynirlerinde (Sommerer ve ark., 2001) ise daha çok β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelen peptidlerin bulunduğu belirlenmiştir. Peynirlerde meydana gelen peptid modellerinde gözlemlenen bu farklılıklar aktif proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Swaisgood (2003) β-KN'in ilk 21 amino asidinden sonraki bölgenin hidrofobik özellik gösterdiğini, C terminal ucuna doğru hidrofobisitenin arttığını ve ilk 21 amino asit R gruplarını içeren bölgenin ise hidrofilik olduğunu bildirmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde, α_{s1}-KN'de olduğu gibi β-KN'in de hidrofobik bölgelerinden daha fazla parçalandığı görülmüştür. Bu durum, α_{s1}- ve β-KN'deki hidrofobik bölgelerin peynirde mevcut proteolitik enzimlere karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. β-KN'in hidrofobik bölgesinden 71 peptid, hidrofilik bölgesinden 1 peptid, β-KN (17-21),

ve hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgeleri içeren 1 peptid, β-KN (16-29), tanımlanmıştır. Hidrofobik bölgeden meydana gelen β-KN türevli peptidlerin 58-222 amino asitleri arasında bulunduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Sadat-Mekmene ve ark. (2011) tarafından β-KN'in 28-207 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara, Miclo ve ark. (2012) tarafından β-KN'in 57-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara ve Chang ve ark. (2013) tarafından β-KN'in 127-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *B. longum*'a ait proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, mikrobiyal proteolitik enzimlerin daha çok β-KN'in hidrofobik bölgelerini etkilediği görülmektedir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan β-KN türevli peptidlerin 5-24 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha uzun zincirli β-KN türevli peptidler belirlenmiştir. Bu durumun, peynirdeki proteolitik enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN'ler üzerinde farklı aktivite göstermesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Uzun peptidlerin, genellikle β-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden meydana geldiği görülmüştür. Coalho peynirlerinde 7-26 (Fontenele ve ark., 2017), 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 9-24 (Gagnaire ve ark., 2011), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 5-12 (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 (Sagardia ve ark., 2013) ve 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 3-20 (Gagnaire ve ark., 2001) amino asit uzunluğuna sahip β-KN türevli peptidlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptidlerde pentapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu 9-16 amino asit dizilimlerinden oluşan peptidlerin takip ettiği görülmüştür. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) da 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde β-KN türevli pentapeptidlerin baskın olduğunu belirlemişlerdir.

β-KN'in parçalanma ürünleri olan antibakteriyal kazesidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI) ve kazesidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV-sığır, YQEPVLGPVRGPFPILV-koyun ve keçi) peptidleri tanımlanmıştır (Birkemo ve ark., 2009). β-KN türevli kazesidin 15 ve kazesidin 17 peptidlerine Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca bu peptidlerin parçalanma ürünleri olan 14 peptidin daha bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler; YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFPIL,

QEPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, PVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPIL, LGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, VRGPFPILV ve FPILV sekanslarından oluşmaktadır. Kazesidin 15 ve 17'nin parçalanma ürünleri olan bu peptidlerin karboksipeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz ve endopeptidaz aktivitelerine bağlı olarak meydana geldiği görülmektedir. Bu enzimlerin, peynirlerin mikrobiyotasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çeşitli mikrobiyal hücre duvarı ilişkili proteinazlar ile β-KN'in parçalanması sonucu antihipertansif beta kazokinin 7 (AVPYPQR) ve 10 (YQQPVLGPVR) peptidlerinin oluştuğu bildirilmiştir (Meisel ve Bockelmann, 1999). Ancak, bu peptidlere Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmamıştır. Ayrıca, β-KN'in parçalanması sonucu opioid özellikli β-kazomorfin 4 (YPFP), β-kazomorfin 5 (YPFPG), β-kazomorfin 6 (YPFPGP), β-kazomorfin 7 (YPFPGPI), β-kazomorfin 8 (YPFPGPIP), β-kazomorfin 9 (YPFPGPIPN), β-kazomorfin 10 (YPFPGPIHNS), β-kazomorfin 11 (YPFPGPIPNSL) ve β-kazomorfin 13 (YPFPGPIHNSLPQ) gibi beta kazomorfinlerin de meydana geldiği rapor edilmiştir (Jinsmaa ve Yoshikawa, 1999; Nguyen ve ark., 2015). Bu opioid peptidler arasından β-kazomorfin 7'nin tip I diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırdığı için insan hastalıklarının gelişiminde bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Nguyen ve ark., 2015). Ancak, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde beta kazomorfin türevli peptidler gözlemlenmemiştir.

Demirci (2019) 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde *E. faecium*, *E. hirae* ve *E. durans* gibi enterokok suşlarının baskın olarak bulunduğunu, bununla birlikte daha az oranda *Lc. lactis* ve *L. plantarum* suşlarının da bulunduğunu bildirmiştir. Bu mikrobiyotaya ait enzimlerin Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in türevli peptidlerin oluşumunda önemli bir paya sahip olduğu düşünülmektedir. Requena ve ark. (1993) geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının hücre duvarı ilişkili proteinaz aktivitesinin α_{s1}-KN'e kıyasla daha çok β-KN üzerinde gerçekleştiğini ve *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar ilgili suşlar arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini *L. plantarum* suşlarında belirlemişlerdir. Herreros ve ark. (2003) İspanyol Armada peynirinden izole edilen *L. plantarum* suşlarına ait proteolitik enzimlerin alanin, lizin ve lösin bağları üzerinde yüksek düzeyde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, González ve ark. (2010) İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 ve *E. faecalis* GE 2320 suşlarının *Leu. mesenteroides, L.*

paracasei ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla C terminalinde bulunan lösin amino asidine karşı daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Anamur yöresinde tanımlanan beta kazesidin türevli bazı peptidlerin oluşumunda da C terminalindeki lösin amino asidi üzerinde karboksipeptidaz aktivitesi görülmüştür. Aynı araştırmacılar, *Lc. lactis* GE 2363'ün *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların koyun sütünde β-KN türevli LLYQEPVLGPVRGPFPI, FTGPIPN, SLVYPF, QEPVLGPVRGPFPILV ve YQEPVLGPVRGPFPILV peptidlerini meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Bu peptidler, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir.

Igoumenidou ve ark. (2005) Feta peynirinden izole edilen *E. durans* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'e kıyasla β-KN'i daha hızlı hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Serio ve ark. (2010) ise Pecorino Abruzzese peynirinden izole edilen *E. durans* suşlarına ait hem hücre içi hem hücre dışı proteolitik enzimlerin *E. faecium* suşlarına kıyasla daha yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Veljovic ve ark. (2009) *E. faecium* suşlarına ait hücre dışı proteinazların β-KN üzerinde aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Dolasıyla, enterokoklara ait proteolitik enzimler de Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptidlerin oluşumunda görev almış olabilir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresi boyunca gerçekleşen proteolize bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Olgunlaşma süresinin başında 24 β-KN türevli peptid belirlenirken, 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise 57 β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid sayısında artış gözlemlemiş olup, olgunlaşma süresinin 4. ayından 8. ayına β-KN türevli peptid sayısının 5'ten 22'ye arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) sıvı buzağı renneti ve *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik starter bakteriler kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 13. gününe kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 40. gününde azaldığını bildirmişlerdir, ancak, olgunlaşma süresinin 40. günündeki peptid sayısı olgunlaşma süresinin başından yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, Taivosalo ve ark. (2018) mikrobiyal rennet ve starter kültürler (mezofilik ve termofilik) kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Old Saare peynirlerinde β-KN türevli peptid miktarının olgunlaşma süresinin 3. ayına kadar

arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 8. ayına kadar azaldığını, ancak, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 8. ayında daha yüksek miktarda β-KN türevli peptid bulunduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Gagnaire ve ark. (2011) pıhtısı haşlanan Ragusano peynirinde olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla 7. ayında β-KN türevli peptid sayısının 20'den 10'a düştüğünü tespit etmişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak β-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması, bazı peptidlerin peynirde birikmesi ve bazılarının ise hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 73 farklı çeşitte β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 14 peptidin, DELQDKIHPF, ELQDKIHPF, DKIHPF, SLSQPKVLPVPQ, PVEPF, TQTPVVVPPFLQPEIM, TQTPVVVPPFLQPE, LLYQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPIL ve QEPVLGPVRGPFPI, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerin arasında kazesidin 15 ve 17 peptidlerinin de bulunması dikkat çekmektedir. Olgunlaşma süresinin farklı günlerinde korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de belirlenmiş olup, bu peptidlerin olgunlaşma süresince devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in C terminal bölgesinden (8 adet) meydana geldiği, diğerlerinin ise β-KN'in N terminal (3 adet) ve orta (3 adet) bölgelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde β-KN (93-106) (TQTPVVVPPFLQPE), β-KN (207-220) (QEPVLGPVRGPFPI) ve β-KN (62-67) (DKIHPF) sekanslarını içeren korunmuş bölgelerin de bulunduğu fark edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca korunan peptidler incelendiğinde, çoğunun (12 adet) hidrofobik amino asitlerle bittiği belirlenmiştir. Taivosalo ve ark. (2018) 8 aylık olgunlaşma süresi boyunca genellikle β-KN türevli fosfopeptidlerin peynirde biriktiğini belirlemişlerdir. Serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitlerine protein kinaz enzimi vasıtasıyla fosfat grubunun eklenmesiyle proteinlerde fosforilizasyonun meydana geldiği bildirilmiştir (Chalmers ve ark., 2004). Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde fosfopeptidler ayrıca belirlenmemiştir, ancak, olgunlaşma süresince korunmuş β-KN türevli peptidlerin bazılarında serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitleri görülmüştür. Dolayısıyla, bu peptidlerde de fosforilizasyon meydana gelmiş olabilir.

Biyoaktif peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden meydana geldiği göz önünde bulundurulduğunda, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin biyoaktif özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (Hartmann ve Meisel, 2007). Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen β-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik olmak üzere 8 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlere kıyasla β-KN türevli peptidlerde daha çeşitli biyolojik aktivite görülmüştür. Biyolojik aktivite gösteren peptidler arasında en fazla ACE inhibitörü peptidlere rastlanmış olup bunu antibakteriyal peptidler takip etmiştir.

β-KN türevli 16 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin sayısı, α_{s1}-KN türevli antihipertansif peptidlerin sayısından (25 adet) daha az bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile farklı ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği Çizelge 4.18.'den de görülmektedir. Anamur yöresinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidler; GVPKVKE, DKIHPF, FPPQS, FTGPIPN, SLVYP, DELQDKIHPF, RDMPIQAF, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFP, HLPLPLVQSW, LHLPLP, LLYQEPVLGPVRGPFP, LLYQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPILV ve TQTPVVVPPFLQPEIM peptidlerinden oluşmaktadır. Antihipertansif bu peptidlerin çoğunluğu β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelmiştir. Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların etkisiyle meydana gelen LHLPLP, LLYQEPVLGPVRGPFP, LLYQEPVLGPVRGPFPI, FTGPIPN, QEPVLGPVRGPFPILV ve YQEPVLGPVRGPFPILV peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Villegas ve ark. (2014) QEPVLGPVRGPFP peptidinin %98.61 ACE inhibisyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Quirós ve ark. (2007) ise VLGPVRGPFP peptidinin 137 µM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik fenilalanin amino asidi bulunan peptidlerin prolin amino asidi bulunduranlara kıyasla daha düşük ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. ACE inhibitörü özellik gösteren biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin 12 tanesinde fenilalanin (F), izolösin (I), valin (V),

metiyonin (M) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, diğer ACE inhibitörü peptidlerin C terminal ucundaki son üç amino asitten birinin hidrofobik olduğu gözlemlenmiştir.

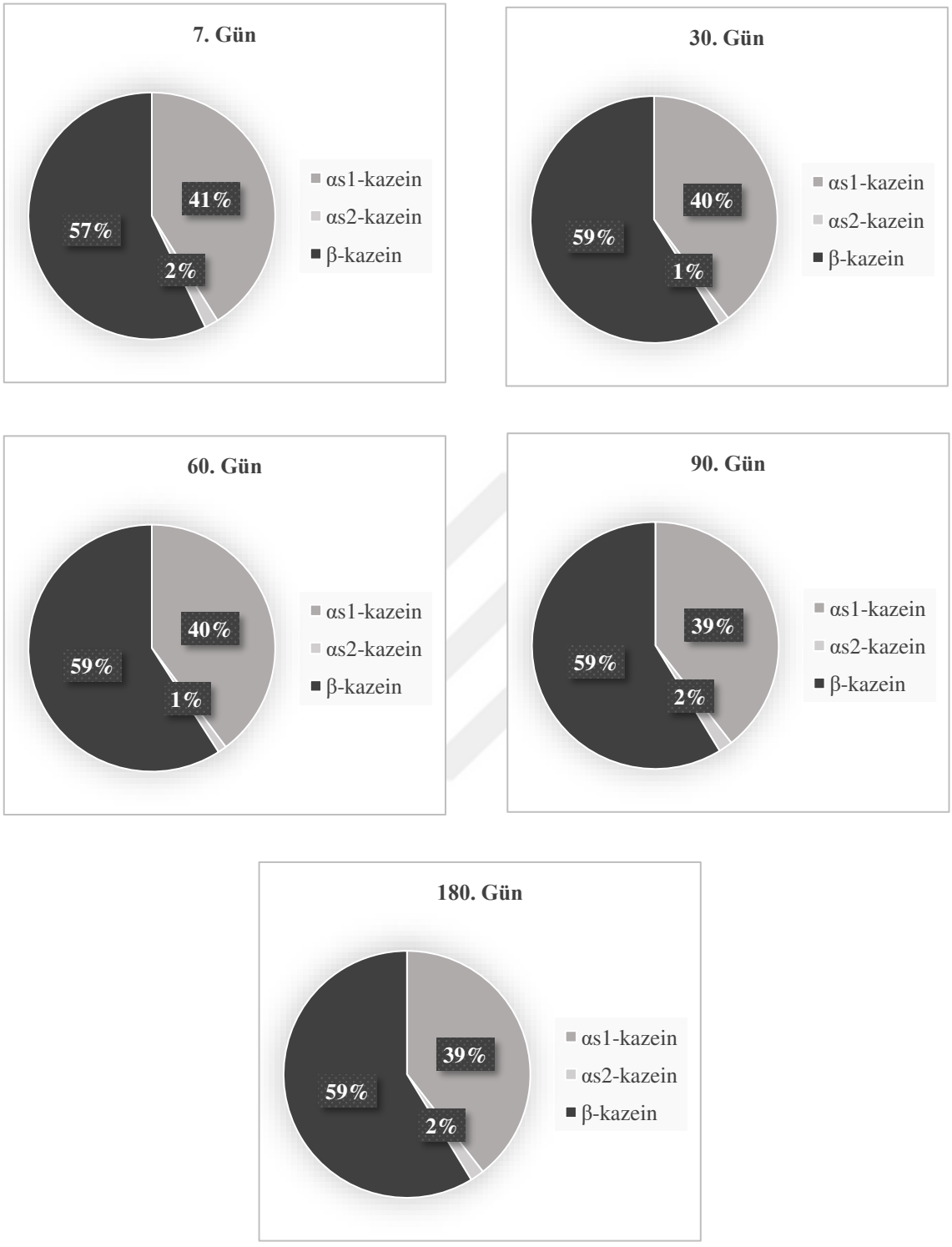
YQEPVLGPVRGPFPIL peptidinin hiperkolesterolemi önleyici ve antioksidan özelliklere sahip çok fonksiyonlu bir peptid olduğu belirlenmiştir (Mahdi ve ark., 2017; Mahdi ve ark., 2018). Bu multifonksiyonel peptid, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tüm olgunlaşma süresi boyunca tespit edilmiştir. β-KN türevli antioksidan bir diğer peptid olan TQTPVVVPPFLQPE peptidi de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ayrıca, bir diğer antioksidan özellikli DMPIQ peptidi Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde yalnızca olgunlaşma süresinin 60. gününde belirlenmiştir. Bu peptidin, RDMPIQAF peptidinin hidrolize olmasıyla meydana geldiği ve olgunlaşma süresinin 60. gününü takiben ileri derecede hidroliz olması sonucu yok olduğu düşünülmektedir. Olgunlaşma süresinin son gününde insülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik gösteren LPLPL peptidinin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, immünomodülatör özellik gösteren EPVLGPVRGPFPI ve LLYQEPVLGPVRGPFPILV peptidleri sırasıyla olgunlaşma süresinin sadece 7. ve 60. günlerinde tanımlanmıştır. Olgunlaşma süresinin 180. gününde meydana gelen LTQTPVVVPPFLQPE peptidinin unutkanlığı önlediği ve beyin fonksiyonlarını artırdığı bildirilmiştir (Ohsawa ve ark., 2013).

Antibakteriyal özellikli ELQDKIHPF ve YQEPVLGPVRGPFPI peptidleri Anamur yöresine ait tulum peynirlerinin tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. YQEPVLGPVRGPFPI, yani kazesidin 15 peptidinin *E. coli* DH5α, *E. coli* DPC6053 ve *Enterobacter sakazakii* DPC5120 suşlarına karşı sırasıyla 0.5, 0.4 ve >1.0 mg/mL'lik MIC değeri ile antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009). Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde, antibakteriyal diğer bir peptid olan RDMPIQAFL peptidine ise yalnızca olgunlaşma süresinin 7. gününde rastlanmıştır. Olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde bu peptidin ileri derecede hidrolize olduğu gözlemlenmiştir. RDMPIQAFL peptidinin *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde antibakteriyal NILPL peptidi tespit edilmiştir. Bu peptidin, *Lactobacillus sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği bildirilmiştir (Losito ve ark., 2006).

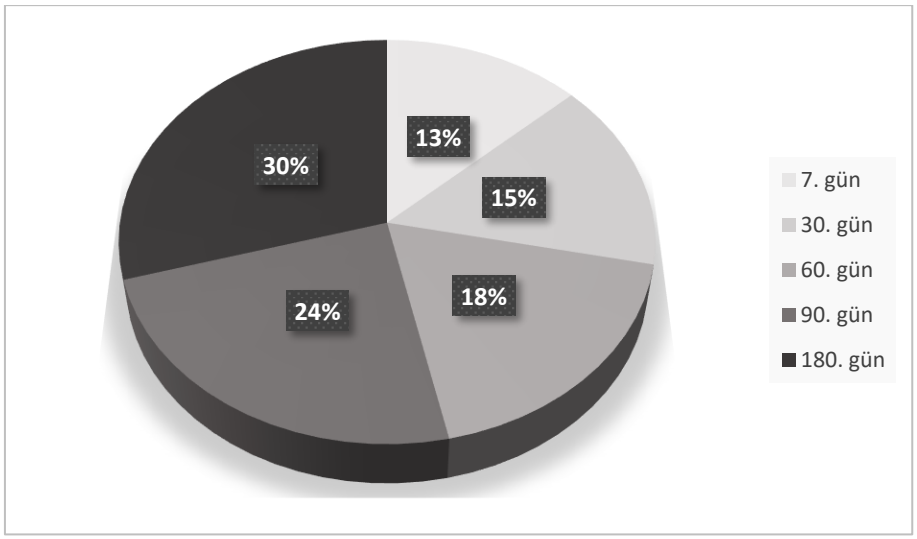
4.3.2. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresince peptid dinamiğinde meydana gelen değişimi gözlemlemek amacıyla Şekil 4.17. düzenlenmiştir. Olgunlaşma süresine bağlı olarak α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein türevli peptidlerin meydana gelme oranları değerlendirilmiştir. Tıpkı Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de κ-kazein türevli peptidler tespit edilmemiştir. Genelde κ-kazein türevli peptidlere peynirde rastlanmadığı daha önce de bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Anamur yöresi ile aynı şekilde Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de β-kazein türevli peptidlerin baskın olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2006) tarafından 2 ay olgunlaştırılan Mahon peynirinde ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde β-kazein türevli peptidlerin peynir ortamında hakim olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin 7. ve 90. günlerinden sonra β-kazein türevli peptidlerin oranı artarken, α_{s1}-türevli peptidlerin oranı azalmıştır. Olgunlaşma süresi boyunca α_{s1}-türevli peptid sayısı artmasına rağmen, α_{s1}-türevli peptid oranında gözlemlenen bu azalış β-kazein oranının artmasına bağlı olarak oransal meydana gelmiştir. Sousa ve ark. (2001) Parmigano-Reggiano ve Emmental peynirlerinde β-kazeinin α_{s1}-kazeinden daha hızlı hidrolize olduğunu rapor etmişlerdir.

Demirci (2019) Mut yöresinde üretilen tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında *L. plantarum* ve *E. faecium* şuşlarının, olgunlaşma süresinin 30. gününde *E. faecium* ve *S. gallolyticus* suşlarının, olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinde *E. faecium, S. gallolyticus* ve *L. plantarum* suşlarının ve olgunlaşma süresinin sonunda ise *E. faecium* suşlarının peynir ortamında hakim olduğunu bildirmiştir. Bu mikrobiyal dinamik sonuçları ile bu çalışmadan elde edilen peptid dinamiği sonuçları karşılaştırıldığında, *E. faecium* ve *S. gallolyticus*'a ait proteazların ve muhtemelen otolize uğramış *L. plantarum*'un hücre içi proteolitik enzimlerinin β-kazeinin parçalanması üzerinde daha etkili olduğu ileri sürülebilir. El Soda ve ark. (1983) aminopeptidaz ve dipeptidaz aktivitelerine sahip hücre içi enzimlerinin β-kazeinin parçalanması üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Khalid ve Marth (1990) *L. plantarum*'un proteolitik sisteminin α_{s1}-kazeine kıyasla β-kazein üzerinde daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.17. Mut yöresine ait tulum peynirlerinden peptid dinamiğinin olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.



Şekil 4.18. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen fonksiyonel peptid sayısının olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Anamur yöresinde olduğu gibi, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de α_{s2}-kazein türevli peptid oranının diğer peptidlere kıyasla daha az olduğu ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde neredeyse sabit kaldığı gözlenmiştir. Olgunlaşma süresince peptid dinamiğinde en önemli rolü sırasıyla β- ve α_{s1}-kazeinlerin aldığı görülmektedir. α_{s2}-kazeinin kimozinden etkilenmediği ve genellikle plazmin aktivitesine bağlı olarak parçalandığı bilinmektedir (McSweeney, 2004). Ayrıca, Larsson ve ark. (2006) peynirde plazmin aktivitesinin pH ile azaldığını ve 5.0-5.2 pH değerlerinde plazmin aktivitesinin çok az olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu çalışmada olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerinin 4.74 ve 5.17 arasında olduğu düşünüldüğünde tulum peynirlerinde plazmin aktivitesinin sınırlı olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak da az sayıda α_{s2}-kazein türevli peptidlerin meydana geldiği öngörülmektedir.

Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak fonksiyonel peptid sayısında da artış gözlenmiştir. Bu durum olgunlaşma süresince artan peptid sayısı ile ilişkilidir. Olgunlaşma süresinin biyoaktif peptid sayısı üzerinde önemli etkiye sahip olduğu görülmektedir. Biyoaktif özellik gösteren peptidlerin α_{s1}-, α_{s1}- ve β-kazein türevli olduğu belirlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen biyoaktif peptidlerin ACE inhibitörü, antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik, GLP-1 artırıcı, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, beyin fonksiyonu artırıcı, antidiyabetik ve katepsin B inhibitörü olmak üzere 10 farklı biyolojik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de ACE inhibitörü peptidlerin sayısı daha yüksek bulunmuştur. Peynir

üzerinde gerçekleştirilen çoğu çalışmada da olgunlaşma boyunca ACE inhibitörü peptidlerin daha yüksek oranda bulunduğu bildirmiştir (Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017). Biyolojik olarak aktif peptidlerin yarısından fazlası β-kazein türevli peptidlerden meydana gelmiştir. Pihlanto ve ark. (2010) çalışmalarında tespit ettikleri ACE inhibitörü peptidlerin β-kazein türevli olduğunu bildirmişlerdir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin Ragusano peynirinden (Gagnaire ve ark., 2011) ve Coalho peynirinden (Fontenele ve ark., 2017) daha fazla çeşitlilikte fonksiyonel peptid içerdiği belirlenmiştir.

4.3.2.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.19.'da sunulmaktadır. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 65 çeşit α_{s1}-KN türevli peptid belirlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde Anamur yöresine kıyasla daha fazla α_{s1}-KN türevli peptid olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonundaki, koagülant çeşidi ve miktarındaki ve üretim metodundaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

α_{s1}-KN'in ilk olarak peynirde kalan koagülantın aktivitesi ile parçalandığı bilinmektedir (Fox ve McSweeney, 1997). Peynir üretiminde, pıhtı pişirme işlemi uygulanması ile koagülantın yani kimozinin aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir ve ayrıca kimozinin inaktive olduğu sıcaklıklarda sütte bulunan doğal katepsin D enziminin α_{s1}-KN'nin parçalanmasına düşük oranda katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Ardö ve ark., 2017). Olgunlaşma sırasında α_{s1}-KN kimozin ile ileri derecede hidrolize olmaktadır ve olgunlaşmanın ilerleyen zamanlarında kimozinin yanı sıra mikrobiyal proteinazlar veya peptidazlar ve daha az olarak plazmin enzimi ile hidrolize olabilmektedir (Ardö ve ark., 2017). Genellikle, peynirde bulunan kazeinler mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalanırken, oligopeptidler de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olmaktadır. *Lactococcus* hücrelerin hücre duvarında bulunan laktosepinin P_{III}-tipi proteinazlarının β-KN'e kıyasla α_{s1}-KN üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Law ve Haandrikman, 1997). *L. helveticus* ait proteolitik enzimlerin α_{s1}-KN üzerindeki aktivitesinin suşlara bağlı olarak değiştiği ve farklı *L. helveticus* suşlarının α_{s1}-KN üzerinde farklı bağları parçaladığı bildirilmiştir (Jensen ve ark., 2009).

Bu çalışmada, genel olarak peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (49 adet) α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği gözlemlenmiştir. Diğer peptidlerin ise α_{s1}-KN'in orta kısmından (16 adet) meydana geldiği tespit edilmiştir. Peynir üzerinde gerçekleştirilen çoğu çalışmada da peptidlerin genellikle α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir (Singh ve ark., 1997; Fernández ve ark., 1998; Sagardia ve ark., 2013; Fontenele ve ark., 2017). Swaisgood (2003) α_{s1}-KN'de 3 farklı hidrofobik bölgenin bulunduğunu ve bu bölgelerin 1-44, 90-113 ve 132-199 fraksiyonlarını içerdiğini bildirmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN, hidrofobik bölgelerinden daha fazla parçalanmıştır. Özellikle α_{s1}-KN (16-44) bölgesinden 33 ve α_{s1}-KN (96-113) bölgesinden 7 olmak üzere toplam 40 hidrofobik peptid tanımlanmıştır. Bu durum hidrofilik bölgenin proteolitik enzimlere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Miclo ve ark. (2012) tarafından α_{s1}-KN'in 1-40 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin ve Chang ve ark. (2013) tarafından α_{s1}-KN'in 8-35 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 50 peptid, Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 34 peptid, Pisanu ve ark. (2015) çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerin 9 ay olgunlaştırılmasından sonra 62 adet α_{s1}-KN türevli peptid ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde 50 adet α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu çalışmada, 6 ay olgunlaştırılan Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla α_{s1}-KN türevli peptidin oluştuğu görülmektedir. Bu farklılıkların üretimde kullanılan süt türü ve ısıl işlem gibi üretim metodundaki farklılıklardan ve peynirlerin mikrobiyotasındaki farklılıklardan meydana geldiği öngörülmektedir. Pisanu ve ark. (2015) pastörizasyon işlemi uygulanan koyun sütlerinden üretilen ve 9 ay olgunlaştırılan peynirlerde çiğ sütten üretilenlere kıyasla peptid miktarının az olduğunu bildirmişlerdir. Losito ve ark. (2006) çeşitli İtalyan peynirlerinin üretiminde farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda suda çözünebilir ekstraktlarda farklı peptidlerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Çizelge 4.19. Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	3.653	1182.6382	α_{s1}-KN (16-25)	Caprine	RPKHPINHQG	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
2	3.729	1125.6185	α_{s1}-KN (16-24)	Caprine	RPKHPINHQ	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)				*	*
3	4.153	643.3667	α_{s1}-KN (33-37)	Bovine	ENLLR	-	-	*				
4	4.611	811.4048	α_{s1}-KN (25-32)	Caprine	GLSPEVPN	-	-			*	*	
5	7.927	720.3054	α_{s1}-KN (70-75)	Caprine	EDAKQM	-	-					*
6	8.614	1622.9002	α_{s1}-KN (16-29)	Ovine	RPKHPIKHQGLSPE	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)		*	*	*	*
7	9.072	1369.7462	α_{s1}-KN (18-29)	Ovine	KHPIKHQGLSPE	-	-			*	*	*
8	10.293	1608.8437	α_{s1}-KN (16-29)	Caprine	RPKHPINHQGLSPE	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
9	10.675	587.2927	α_{s1}-KN (30-34)	Bovine	VLNEN	-	-					*
10	10.980	1355.6915	α_{s1}-KN (18-29)	Caprine	KHPINHQGLSPE	-	-					*
11	11.362	1199.6136	α_{s1}-KN (96-105)	Bovine	IQKEDVPSER	-	-					*
12	11.667	819.5367	α_{s1}-KN (114-119)	Bovine	LRLKKY	-	-					*
13	11.744	914.4710	α_{s1}-KN (19-26)	Caprine	HPINHQGL	-	-					*
14	12.507	584.3526	α_{s1}-KN (125-129)	Ovine	EIVPK	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)					*
15	12.202	766.3623	α_{s1}-KN (23-29)	Caprine	HQGLSPE	-	-					*
16	12.660	1227.6001	α_{s1}-KN (19-29)	Caprine	HPINHQGLSPE	-	-					*
17	12.889	641.3016	α_{s1}-KN (27-32)	Caprine	SPEVPN	-	-					*
18	13.347	501.2436	α_{s1}-KN (25-29)	Caprine	GLSPE	-	-					*
19	14.262	1014.5440	α_{s1}-KN (48-55)	Caprine	RKENINEL	-	-					*
20	14.947	619.2948	α_{s1}-KN (118-122)	Caprine	YNVPQ	-	-					*
21	15.126	754.3855	α_{s1}-KN (26-32)	Caprine	LSPEVPN	-	-			*	*	
22	16.090	757.4079	α_{s1}-KN (32-37)	Bovine	NENLLR	-	-					*
23	16.549	858.4459	α_{s1}-KN (49-55)	Caprine	KENINEL	-	-					*
24	17.388	601.3033	α_{s1}-KN (31-35)	Bovine	LNENL	-	-					*
25	17.564	559.2636	α_{s1}-KN (41-45)	Bovine	APFPE	DPP-4 inhibitörü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, ACE inhibitörü	Boots (2012); Boots (2013); Abdel-Hamid ve ark. (2017)				*	*

26	18.379	988.5674	α_{s1}-KN (116-123)	Caprine	KKYNVPQL	ACE inhibitörü	Ruiz ve ark. (2004)				*	*
27	19.294	870.4936	α_{s1}-KN (31-37)	Bovine	LNENLLR	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017b)		*	*	*	*
28	19.315	721.3653	α_{s1}-KN (107-112)	Bovine	LGYLEQ	-	-				*	
29	19.371	601.3068	α_{s1}-KN (51-55)	Caprine	NINEL	-	-				*	*
30	19.524	700.3759	α_{s1}-KN (30-35)	Bovine	VLNENL	ACE inhibitörü	Benavente ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
31	19.676	730.3474	α_{s1}-KN (50-55)	Caprine	ENINEL	-	-		*	*	*	*
32	19.088	977.4835	α_{s1}-KN (100-107)	Bovine	DVPSERYL	-	-					*
33	19.469	1101.6515	α_{s1}-KN (115-123)	Caprine	LKKYNVPQL	-	-				*	
34	19.545	569.3152	α_{s1}-KN (119-123)	Caprine	NVPQL	-	-		*	*	*	*
35	19.696	2388.2756	α_{s1}-KN (16-36)	Caprine	RPKHPINHQGLSPEVPNENLL	-	-		*			
36	20.002	969.5590	α_{s1}-KN (30-37)	Bovine	VLNENLLR	Antibakteriyal	Hayes ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
37	20.057	1370.8420	α_{s1}-KN (113-123)	Caprine	LRLKKYNVPQL	-	-		*	*	*	*
38	21.507	658.3321	α_{s1}-KN (40-45)	Bovine	VAPFPE	-	-	*	*	*	*	*
39	21.660	593.3071	α_{s1}-KN (107-111)	Bovine	LGYLE	-	-					*
40	21.966	531.3060	α_{s1}-KN (38-42)	Caprine	FVVAP	-	-	*	*	*	*	*
41	22.348	664.3443	α_{s1}-KN (109-113)	Bovine	YLEQL	-	-				*	*
42	22.440	757.4012	α_{s1}-KN (39-45)	Caprine	VVAPFPE	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)	*	*	*	*	*
43	22.577	1021.6208	α_{s1}-KN (121-129)	Ovine	VPQLEIVPK	-	-					*
44	22.959	529.2889	α_{s1}-KN (40-44)	Bovine	VAPFP	-	-		*	*	*	*
45	23.877	714.3906	α_{s1}-KN (31-36)	Bovine	LNENLL	-	-			*	*	*
46	23.954	732.3801	α_{s1}-KN (118-123)	Caprine	YNVPQL	-	-			*	*	*
47	24.107	531.3046	α_{s1}-KN (39-43)	Caprine	VVAPF	-	-		*	*	*	*
48	23.964	713.3950	α_{s1}-KN (25-31)	Ovine	GLSPEVL	-	-	*	*	*	*	*
49	24.412	721.3609	α_{s1}-KN (108-113)	Bovine	GYLEQL	-	-	*	*	*	*	*
50	24.489	1287.7326	α_{s1}-KN (39-49)	Caprine	VVAPFPEVFRK	-	-	*	*	*	*	*
51	24.947	628.3554	α_{s1}-KN (39-44)	Caprine	VVAPFP	-	-	*	*	*	*	*
52	25.029	904.4773	α_{s1}-KN (32-38)	Bovine	NENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*				
53	25.252	813.4578	α_{s1}-KN (30-36)	Bovine	VLNENLL	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
54	25.405	790.4308	α_{s1}-KN (33-38)	Bovine	ENLLRF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
55	25.787	1060.5709	α_{s1}-KN (37-45)	Caprine	RFVVAPFPE	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
56	26.323	757.3990	α_{s1}-KN (40-46)	Bovine	VAPFPEV	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
57	26.477	1060.5682	α_{s1}-KN (40-48)	Caprine	VAPFPEVFR	-	-				*	

58	27.011	1017.5595	α_{s1}-KN (31-38)	Bovine	LNENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
59	27.470	834.4477	α_{s1}-KN (107-113)	Bovine	LGYLEQL	-	-			*	*	*
60	27.699	856.4686	α_{s1}-KN (39-46)	Caprine	VVAPFPEV	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
61	27.929	1116.6277	α_{s1}-KN (30-38)	Bovine	VLNENLLRF	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
62	28.158	1159.6352	α_{s1}-KN (39-48)	Caprine	VVAPFPEVFR	-	-	*	*	*	*	*
63	28.463	904.4669	α_{s1}-KN (38-45)	Caprine	FVVAPFPE	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
64	30.294	775.4320	α_{s1}-KN (38-44)	Caprine	FVVAPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
65	32.660	1003.5370	α_{s1}-KN (39-47)	Caprine	VVAPFPEVF	ACE inhibitörü	Espejo-Carpio ve ark. (2013)			*	*	*
Toplam								**23**	**29**	**35**	**43**	**57**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_851372, NP_001272624, NP_001009795). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı: glukagon benzeri peptid-1 sekresyonunu artırarak insülin salımını artırmakta ve iştahı azaltmaktadır, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidlerin 5-21 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Sagardia ve ark. (2013) 4 ay olgunlaştırılan Idizabal peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli peptidlerin 6-17 amino asit uzunluğuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Fontenele ve ark. (2017) Coalho peynirinde 5-23 amino asit uzunluğuna sahip α_{s1}-KN türevli peptidler belirlemişlerdir. Biyoaktif peptidlerin kısa amino asit dizilerini içeren peptidlerden meydana geldiği göz önünde bulundurulduğunda bu peptidlerin biyoaktif olma potansiyeli çok yüksektir (Hartmann ve Meisel, 2007). Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptidler arasında pentapeptidlerin, hekzapeptidlerin ve heptapeptidlerin baskın olduğu görülmüştür. Anamur yöresine kıyasla Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla sayıda kısa peptidlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durum, Mut yöresine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyotaya bağlı olarak proteolitik enzim aktivitesinin daha yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir.

Peynirlerde, α_{s1}-KN'in hidrolizi sonucunda israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana geldiği birçok çalışmada bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009; Pisanu ve ark., 2015; Georgalaki ve ark., 2017). İsrasidin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinde bulunan ve 23 amino asit uzunluğuna sahip antimikrobiyal bir peptiddir (Pisanu ve ark., 2015). İsrasidin peptidinin dizilimi birkaç amino asitte gözlemlenen farklarla birlikte süt çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Sforza ve ark., 2011). Bu antimikrobiyal peptid, inek sütünde RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden, koyun sütünde RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden ve keçi sütünde RPKHPINHQGLSPEVPNENLLRF amino asit dizilimlerinden meydana gelmektedir. İsrasidin, α_{s1}-KN'in kimozin ile parçalanması sonucu oluşmaktadır (Lahov ve Regelson, 1996). Ayrıca, ilerleyen olgunlaşma günlerinde israsidin ileri derecede hidrolize uğramaktadır. Saito ve ark. (2000) Gouda peynirlerinde israsidinin hidrolizi sonucu RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Sagardia ve ark. (2013) 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirinde israsidin peptidinin parçalanma ürünlerinin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Fontenele ve ark. (2017) de Coalho peynirinde israsidinin C terminal bölgesinin hidrolize olmasıyla EVLNENLLR, NENLLRF, EVLNENLLRF ve VLNENLLRF peptidlerini belirlemişlerdir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde toplam 28 peptidin israsidin türevli olduğu gözlemlenmiştir. Anamur yöresine kıyasla (18 peptid) israsidin türevli peptidlerin Mut

yöresinde daha fazla görülmesi tulum peyniri üretiminde kullanılan koagülant miktarının ve çeşidinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. α_{s1}-KN'lerden 10 tanesinin, α_{s1}-KN (16-24), α_{s1}-KN (16-25), α_{s1}-KN (16-29/bovine), α_{s1}-KN (16-29/caprine), α_{s1}-KN (16-36), α_{s1}-KN (18-29/bovine), α_{s1}-KN (18-29/caprine), α_{s1}-KN (19-26), α_{s1}-KN (19-29) ve α_{s1}-KN (23-29), israsidinin N terminalinden bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. Çizelge 4.19'da meydana gelen peptidlerin süt kaynağı daha detaylı olarak sağlanmıştır, burada peptidlerin farklılığını belirtmek amacıyla inek veya keçi sütüne ait olduğu belirtilmiştir. İsrasidinin orta bölgesinden 5 peptid, α_{s1}-KN (25-29), α_{s1}-KN (25-31), α_{s1}-KN (25-32), α_{s1}-KN (26-32) ve α_{s1}-KN (27-32), tanımlanmıştır. İsrasidinin C terminalinden bölgesinden ise 13 peptid, α_{s1}-KN (30-34), α_{s1}-KN (30-35), α_{s1}-KN (30-36), α_{s1}-KN (30-37), α_{s1}-KN (30-38), α_{s1}-KN (31-35), α_{s1}-KN (31-36), α_{s1}-KN (31-37), α_{s1}-KN (31-38), α_{s1}-KN (32-37), α_{s1}-KN (32-38), α_{s1}-KN (33-37) ve α_{s1}-KN (33-38), tanımlanmıştır. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile koyun sütünde israsidinin C terminal bölgesinden NENLLR peptidinin meydana geldiğini belirlemiş olup, *Lc. lactis*'e ait proteazların özellikle C terminalindeki fenilalanin (F) ve lösin bağlarını (L) etkilediğini bildirmişlerdir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde israsidin türevli peptidler incelendiğinde, genel olarak karboksipeptidaz aktivitesine bağlı olarak parçalanmalar görülmektedir. Dolayısıyla, diğer proteolitik enzimlere kıyasla karboksipeptidazların israsidin üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Mezofilik *Lactobacillus* suşlarında oligopeptidlerin C terminalinin hidrolizinde etkili olan karboksipeptidazların tanımlandığı, ancak genellikle *Lactococcus* türlerine ait suşlarda bu enzime rastlanılmadığı bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017). Bununla birlikte, González ve ark. (2010) İspanyol peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 suşunun düşük düzeyde karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, muhtemel karboksipeptidaz aktivitesi Demirci (2019) tarafından Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen mezofilik *L. plantarum, L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarından kaynaklanmış olabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde, α_{s1}-KN'de israsidin peptidini takip eden bölgeden 20 adet peptidin, α_{s1}-KN (37-45), α_{s1}-KN (38-42), α_{s1}-KN (38-44), α_{s1}-KN (38-45), α_{s1}-KN (39-42), α_{s1}-KN (39-44), α_{s1}-KN (39-45), α_{s1}-KN (39-46), α_{s1}-KN (39-47), α_{s1}-KN (39-48), α_{s1}-KN (39-49), α_{s1}-KN (40-44), α_{s1}-KN (40-45), α_{s1}-KN (40-46), α_{s1}-KN (40-48), α_{s1}-KN (41-45), α_{s1}-KN (48-55), α_{s1}-KN (49-55), α_{s1}-KN (51-55) ve α_{s1}-KN (51-55), meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, α_{s1}-KN'nin orta bölgesinden de parçalanmalar olduğu ve 16 adet peptidin, α_{s1}-KN (96-105), α_{s1}-KN (100-107), α_{s1}-KN

(107-111), α_{s1}-KN (107-112), α_{s1}-KN (107-113), α_{s1}-KN (108-113), α_{s1}-KN (109-113), α_{s1}-KN (113-123), α_{s1}-KN (114-119), α_{s1}-KN (115-123), α_{s1}-KN (116-123), α_{s1}-KN (118-122), α_{s1}-KN (118-123), α_{s1}-KN (119-123), α_{s1}-KN (121-129) ve α_{s1}-KN (125-129), oluştuğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, α_{s1}-KN'in orta bölgesinden hemen önce bir peptid, α_{s1}-KN (70-75), gözlemlenmiştir. α_{s1}-KN'nin orta bölgesinde karboksipeptidaz, aminopeptidaz ve endopeptidaz aktivitelerinin gerçekleşmesine bağlı olarak peptidlerin meydana geldiği görülmektedir.

Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde α_{s1}-KN türevli NENLLRF ve VLNENLLRF peptidleri ve Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde ENINEL, VVAPFPE, VVAPFP, VAPFP ve APFPE peptidleri belirlenmiştir. Sadat-Mekmene ve ark. (2011) *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'nin N terminal bölgesinden C terminal bölgesine kadar çok çeşitli bölgelerde etkinlik göstermesi sonucu çok sayıda peptidin meydana geldiğini bildirmiştir. Diğer taraftan, Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteazların koyun ve inek sütünde israsidin peptidini takip eden sıradaki FVVAPFP, FVVAPFPE, FVVAPFPEVF, VVAPFPE, VAPFPE, VAPFPEVF, VAPFPEVFG, APFPEVF ve FPEVF peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Benzer peptidler bu çalışmada da tanımlanmıştır. Zaten, Demirci (2019) tarafından Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başlarında *Lc. lactis* suşlarının bulunduğunu bildirmiştir.

Veljovic ve ark. (2009) fermente edilmiş gıdalardan izole edilen *E. faecalis* suşlarının α_{s1}-KN'in yüksek oranda hidrolizine neden olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Suzzi ve ark. (2000) geleneksel İtalyan keçi peynirlerinden izole edilen enterokok suşları arasında en yüksek proteolitik aktivitenin *E. faecalis* suşlarında olduğunu ve bunu sırasıyla *E. faecium* ve *E. hirae*'nin takip ettiğini belirlemişlerdir. González ve ark. (2010) geleneksel İspanyol peynirlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini ve buna kıyasla daha düşük oranda aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *E. faecalis*'e ait proteolitik enzimlerin dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini de tespit etmişlerdir. Igoumenidou ve ark. (2005) Feta peynirinden izole edilen *E. durans* şusuna ait hücre duvarı ilişkili enzim preparatlarının α_{s1}-KN'in hidrolizi üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca *E. faecium*, *E. hirae, E. durans* ve *E. faecalis* suşları izole edilip tanımlanmıştır ve *Enterococcus* suşlarının baskın olarak peynir mikrobiyotasında

bulunduğu bildirilmiştir (Demirci, 2019). Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde bu suşlara ait proteolitik enzimlerin peptidlerin oluşumu üzerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca belirlenen α_{s1}-KN türevli peptid sayısında gerçekleşen proteolize bağlı olarak önemli ölçüde artış belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında 23 α_{s1}-KN türevli peptid belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise 57 α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla 8. ayında daha fazla α_{s1}-KN türevli peptid belirlemişlerdir. Ancak, bu çalışmanın bulgularından farklı bir şekilde, Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaşma süresinin sonunda Ragusano peynirinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısının 34'ten 13'e düştüğünü bildirmişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olmasından, bazı peptidlerin peynirde birikmesinden ve bazılarının ise hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesinden kaynaklanmış olabilir. Peptidlerdeki bu değişimlerin peynir üretim metoduna, kullanılan süte ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olarak proteolitik sisteminin çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidler ve peptid dinamiği bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 65 farklı çeşitte α_{s1}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 21 peptidin, RPKHPINHQG, RPKHPINHQGLSPE, VLNENL, VLNENLLR, VAPFPE, FVVAP, VVAPFPE, GLSPEVL, GYLEQL, VVAPFPEVFRK, VVAPFP, VLNENLL, ENLLRF, RFVVAPFPE, VAPFPEV, LNENLLRF, VVAPFPEV, VLNENLLRF, VVAPFPEVFR, FVVAPFPE ve FVVAPFP, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu korunmuş peptidlerden GYLEQL dışındaki peptidlerin hepsinin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği görülmektedir. Korunmuş peptidlerin yarısı israsidinin parçalanma ürünlerinden diğer yarısı da α_{s1}-KN'de israsidini takip eden bölgenin parçalanmasıyla meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu peptidlerden, 15 tanesi Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ancak, Anamur yöresinden farklı olarak Mut yöresine ait tulum peynirlerinde RPKHPINHQG, FVVAP, GLSPEVL, VVAPFPEVFRK, VAPFPEV ve FVVAPFP peptidlerinin olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin farklı aşamalarında korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma

ürünleri de belirlenmiş olup, olgunlaşma süresince bu peptidlerin devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gagnaire ve ark. (2011) Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca RPKHPIKHQ, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, NENLLRF ve FVAPFPEVFGKEKV peptidlerinin bulunduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacılar da genellikle israsidin kökenli peptidlerin kaldığını tespit etmişlerdir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve DPP-4 inhibitörü olmak üzere 5 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Genel olarak ACE inhibitörü peptid sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile ACE inhibitörü peptidlerin sayısında artış görülmüştür. Bu durum ilerleyen olgunlaşma günlerinde meydana gelen peptidlerin ACE inhibitörü olduklarını göstermektedir. Mut yöresinde belirlenen α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptidler; RPKHPINHQG, RPKHPINHQ, RPKHPIKHQGLSPE, RPKHPINHQGLSPE, VLNENLLRF, VLNENLL, VLNENL, ENLLRF, VVAPFPEVF, FVVAPFPE, FVVAPFP, VVAPFPE, VAPFPEV, KKYNVPQL, EIVPK ve APFPE peptidlerinden oluşmaktadır. Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* ve *Lc. lactis* proteazlarının aktivitesiyle oluşan FVVAPFPE ve FVVAPFP peptidlerinin yüksek düzeyde antihipertansif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Saito ve ark. (2000) 8 ay olgunlaştırılan Gouda peynirlerinde yüksek ACE inhibitörü özellik gösteren RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerini tespit etmişlerdir. Ruiz ve ark. (2004) Manchego peynirinden izole edilen KKYNVPQL peptidinin 77.1 µM IC_{50} değeri ile yüksek düzeyde ACE inhibitörü aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. ACE inhibitörü biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Bu çalışmada belirlenen ACE inhibitörü peptidlerin çoğunda da fenilalanin (F), lösin (L), valin (V), glisin (G) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmektedir. Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik prolin amino asidi bulunan peptidlerin daha yüksek ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini, fenilalanin bulunanların ise daha düşük oranda ACE inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir.

APFPE peptidinin ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü ve GLP-1 sekresyonunu artırıcı özelliklere sahip çok fonksiyonlu bir peptid olduğu belirlenmiştir (Boots, 2012; 2013; Abdel-Hamid ve ark., 2017). Bu peptid, Mut yöresine ait tulum peynirlerinin

olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde tespit edilmiştir. GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve dolasıyla insülin salımının artmasına bağlı olarak iştahı azaltan diğer peptidlerden NENLLRF olgunlaşma süresinin başında ve LNENLLRF ise tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, tip II diyabeti üzerinde etkili DPP-4 inhibitörü özellik gösteren bir diğer peptid LNENLLR ise olgunlaşma süresinin 30. gününden 180. gününe kadarki periyotta görülmüştür.

Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen antibakteriyal peptidler Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Antibakteriyal özelliklere sahip VLNENLLR, RFVVAPFPE ve VVAPFPEV peptidleri tıpkı Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi 180 gün boyunca tüm olgunlaşma günlerinde belirlenmiştir. Rizzello ve ark. (2005) RFVVAPFPE ve VVAPFPEV peptidlerinin *Lactobacillus sakei, Lactobacillus helveticus, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Escherichia coli, Bacillus megaterium, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Salmonella* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı antibakteriyal özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hayes ve ark. (2006) ise VLNENLLR peptidinin *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 ve *Escherichia coli* DPC5063'e karşı yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

VLNENLL peptidinin hem antioksidan hem ACE inhibitörü özellik göstererek çok fonksiyonlu bir peptid olduğu belirlenmiştir (Hernández-Ledesma ve ark., 2005). Bu peptid, tüm olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin (Y) amino asitlerini içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu durum Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen VLNENLL peptidinin de N terminal bölgesinde hidrofobik valin amino asidinin bulunması ile uyumluluk göstermektedir.

4.3.2.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.20.'de sunulmaktadır. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 7 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Anamur yöresine kıyasla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla α_{s2}-KN türevli peptid gözlemlenmiştir. Bu farklılığın kullanılan süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi,

koagülant miktarı, aktif peynir mikrobiyotası ve üretim metodu ile ilgili farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin, 1 tanesi N terminal bölgesinden, 3 tanesi orta bölgeden ve 3 tanesi C terminal bölgesinden meydana gelmiştir. Genellikle, meydana gelen peptidlerin büyük bir çoğunluğunun α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgesinden oluştuğu görülmektedir. Peynirler üzerinde gerçekleştirilen çoğu çalışma da α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgesinden meydana gelen peptidlerin bulunduğu tespit edilmiştir (Gagnaire ve ark., 2011; Sagardia ve ark., 2013; Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017).

α_{s2}-KN'in plazmin aktivitesine karşı çok duyarlı olduğu ve α_{s1}-KN'e kıyasla kimozin enzimine karşı daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994; Fox ve McSweeney, 1996). Plazminin, α_{s2}-KN üzerinde özellikle lizin amino asidi bulunan bağlara etki etmesiyle birlikte daha az oranda arjinin amino asidi bulunan bağlarda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Plazmin aktivitesi ile α_{s2}-KN'in çoğunlukla C terminal ve orta bölgelerinden peptidlerin oluştuğunu bildirilmiştir (Dalsgaard ve ark., 2008). Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgesinden tanımlanan peptidler plazmin aktivitesini desteklemektedir. Ayrıca, sütte doğal olarak bulunan diğer bir enzim olan katepsin D'nin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgelerinde bulunan lösin ve tirozin bağlarında etkili olduğu bildirilmiştir (Larsen ve ark., 1996). Bununla birlikte, peynirlerin olgunlaşması sırasında mikrobiyal proteolitik enzimler vasıtasıyla α_{s2}-KN ileri derecede hidroliz olabilmektedir (Broadbent ve ark., 2002; Bounouala ve ark., 2017; Solieri ve ark., 2018).

Manchego peynirlerinde 12 adet (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), Idiazabal peynirlerinde 11 adet (Sagardia ve ark., 2013) ve Coalho peynirinde 5 adet (Fontenele ve ark., 2017) α_{s2}-KN türevli peptid tanımlamıştır. Manchego ve Idiazabal peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptid sayısından daha yüksek çıkmıştır. Ancak, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptidler çeşit olarak bu peynirlerdekinden tamamen farklılık göstermektedir. Peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında ve çeşidinde gözlemlenen farklılıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, koagülant miktarına, koagülant çeşidine ve farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidler, bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Çizelge 4.20. Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	11.591	883.4924	α_{s2}-KN (207-213)	Caprine	KPWTQPK	-	-		*	*	*	*
2	11.973	837.4289	α_{s2}-KN (41-47)	Caprine	NMAIHPR	Hipokolesterolemik, ACE inhibitörü	Fatchiyah ve Natasia (2018); Moreno-Montoro ve ark. (2018)					*
3	12.202	658.3435	α_{s2}-KN (209-213)	Caprine	WTQPK	-	-					*
4	13.271	784.4319	α_{s2}-KN (80-86)	Caprine	VAPEEIK	-	-					*
5	14.795	1088.4406	α_{s2}-KN (75-84)	Caprine	EESAEVAPEE	-	-					*
6	19.142	689.3394	α_{s2}-KN (132-138)	Caprine	AGPFTPT	-	-				*	*
7	22.210	663.3002	α_{s2}-KN (191-195)	Caprine	AWPQY	-	-	*				
Toplam								**1**	**1**	**1**	**2**	**6**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_776953, NP_001272514, NP_001009363). KN: kazein.
[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, Hipokolesterolomik: kolesterol düşürücü.
[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin 5-10 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler arasında heptapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu pentapeptidlerin takip ettiği görülmüştür. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi 6 ve 8 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidler Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmemiştir. Bu durum proteolitik enzim çeşitliliğinin ve dolayısıyla enzim aktivitesinin Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde farklı olduğunu göstermektedir. Sommerer ve ark. (2001) 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 4-6 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidler tanımlamışlardır. Ayrıca, 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 10-13 (Gagnaire ve ark., 2011), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 4-10 (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirinde 7-17 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid uzunluğu Manchego peynirinde gözlemlenen α_{s2}-KN türevli peptidlere daha yakın bulunmasına rağmen, her iki peynirde de farklı peptidler belirlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, bu durum proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Biyoaktif peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden meydana geldiği bildirilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007). Ancak, Mut yöresinde belirlenen kısa zincirli α_{s2}-KN türevli peptidlerden yalnızca NMAIHPR, α_{s2}-KN (41-47), peptidinin biyoaktif özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu peptidinin hem tansiyon düşürücü hem de kolesterol düşürücü özelliklere sahip multifonksiyonel bir peptid olduğu belirlenmiştir. Fatchiyah ve Natasia (2018) bu peptidin kolesterol biyosentezinde görev alan HMGR (3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA redüktaz) enzimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Moreno-Montoro ve ark. (2018) NMAIHPR peptidinin antihipertansif potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

α_{s2}-KN üzerinde 90-120 ve 160-207 bölgelerinden oluşan iki hidrofobik alanın bulunduğu bildirilmiştir (Swaisgood, 1992). Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN (191-195) dışındaki tüm α_{s2}-KN türevli peptidlerin hidrofilik bölgelerden meydana geldiği görülmüştür. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrofilik bölgesinin peynirdeki proteolitik enzimlere karşı daha duyarlı olduğu söylenebilir. Rauh ve ark. (2014) plazmin enziminin en yüksek aktiviteyi α_{s2}-KN üzerindeki hidrofilik bölgelerde gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hidrofobik bölgede belirlenen AWPQY peptidi kalan koagülant yani kimozin aktivitesine, katepsin D aktivitesine veya mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Kimozin enziminin α_{s2}-KN üzerinde yalnızca hidrofobik bölgelerde aktivite gösterdiği bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994). Ayrıca, α_{s2}-KN üzerinde AWPQY peptidinden sonra lösin amino asidi bulunmaktadır, bu da lösin amino asitlerine ait peptid bağlarında aktivite gösteren katepsin D'nin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, AWPQY peptidinin kazosidin peptidinin parçalanma ürünü olduğu görülmektedir. Kazosidin, α_{s2}-KN türevli 39 amino asitten oluşan ve antibakteriyal özelliklere sahip bir peptiddir (Zucht ve ark., 1995). Keçi sütünde KTKLTEEEKNRLNFLKKISQYYQKFAWPQYLKTVDQHQK amino asit dizilimlerinden oluşmaktadır. Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait peptidazların ve proteinazların α_{s2}-KN türevli kazosidin peptidini parçaladıklarını bildirmişlerdir. Dolayısıyla, kazosidinin parçalanma ürünü olan AWPQY peptidinin oluşumunda mikrobiyal enzimler de görev almış olabilir. Pisanu ve ark. (2015) pastörize ve çiğ koyun sütünden üretilen ve 9 olgunlaştırılan peynirlerde AWPQY peptidini içeren ancak daha uzun 2 α_{s2}-KN türevli peptid tanımlamışlardır. Hidrofobik bölgelerde bulunan bu peptidler, LKKISQYYQKFAWPQYL ve QKFAWPQYLK amino asit dizilerinden oluşmaktadır. Farklı peynir türlerinde hidrofobik bölgeden değişik parçalanma ürünlerinin gözlemlenmesi üretimde tercih edilen süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi, koagülant aktivitesi ve plazmin aktivitesi gibi parametrelerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

α_{s2}-KN'in hidrofilik bölgelerinden ise NMAIHPR, EESAEVAPEE, VAPEEIK, AGPFTPT, KPWTQPK ve WTQPK peptidleri tanımlanmıştır. Tansiyon düşürücü ve kolesterol düşürücü özelliklere sahip NMAIHPR peptidi α_{s2}-KN'in N terminal bölgesinden meydana gelmiştir, bu peptidin öncesinde ve sonrasında lizin amino asidi bulunması oluşumunda özellikle lizin bağları üzerinde aktivite gösteren plazmin enziminin etkili olabileceğini göstermektedir (Bastian ve ark., 1997). Bununla birlikte, EESAEVAPEE, VAPEEIK ve AGPFTPT peptidleri α_{s2}-KN'in orta bölgesinden meydana gelmiştir. Bu peptidler, mikrobiyal proteolitik enzimlerle meydana gelmiş olabilir. Çünkü α_{s2}-KN'inde genel olarak bu peptidlerden önce veya sonra plazmin enziminin etkili olduğu lizin ve arjinin amino asitlerine ait bağlar bulunmamaktadır. KPWTQPK ve WTQPK peptidleri ise α_{s2}-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelmiştir ve bu peptidlerin başında veya sonunda lizin amino asitlerine ait bağlar bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu peptidlerin oluşumunda plazmin enziminin görev aldığı

düşünülebilir. Ayrıca, WTQPK peptidinin dipeptidaz aktivitesine bağlı olarak KPWTQPK peptidinden oluştuğu görülmektedir. Buna bağlı olarak, WTQPK peptidi mikrobiyal proteolitik enzimler vasıtasıyla meydana gelmiş olabilir. Theriot ve ark. (2009) bir dipeptidaz olan mikrobiyal prolidazların sonunda prolin bulunan dipeptidleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Sousa ve ark. (2001) laktik asit bakterilerinin prolidaz enzimine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu çalışmada da KP peptidi hidroliz olduğu için, muhtemel prolidaz aktivitesine bağlı olarak WTQPK peptidinin oluştuğu düşünülmektedir.

Demirci (2019) 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca genel olarak Mut yöresine ait tulum peynirlerinde *E. faecium* ve *L. plantarum* suşlarının baskın olduğunu belirlemiştir ve bu olgunlaşma süresince peynirlerde *E. hirae, E. durans, E. faecalis, Lc. lactis, L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının da bulunduğunu tespit etmiştir. İlgili araştırmacı, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinden farklı olarak Mut yöresine ait tulum peynirlerinde *E. faecalis, L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının bulunduğunu gözlemlemiştir. Dolayısıyla, bu farklı mikrobiyota Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptidlerin daha fazla meydana gelmesine neden olmuş olabilir. Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *L. paracasei* suşlarının *Lc. lactis* ve *E. faecium* suşlarına oranla çok yüksek düzeyde prolidaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'nin parçalanmasında ön görülen prolidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir.

Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların koyun sütünde α_{s2}-KN'in orta bölgesinden YQKFPQY, LYQGPIVLNPW ve YQGPIVLNPW peptidlerini meydana getirdiğini ve *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile inek sütünde ise α_{s2}-KN türevli peptidlerin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e hücre dışı proteinazların koyun sütünde VSSSEEPINI, ALNEINQF, FPQYL, ISQYYQK, FAWPQY, TNAIPY peptidlerini ve inek sütünde ise yalnızca NPWDQ peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Suş ve süt türüne göre meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin değiştiği bu araştırmacılara ait çalışmadan görülmüştür. Broadbent ve ark. (2002) *Lc. lactis*'e ait hücre duvarı ilişkili proteinazın (laktosepin) Cheddar peynirinde α_{s2}-KN (f 1-21) peptidinin oluşumundan sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Moreno-Montoro ve ark. (2018) ise *S. thermophilus, L. bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde α_{s2}-KN türevli IYKQEK, NMAIHPR, YQKFPQY, LQYPYQGPIVL, LKKISQ, LKKISQY, LKTVDQHQK, TVDQHQK, VDQHQK ve AMKPWTQPK peptidlerinin meydana

geldiğini gözlemlemişlerdir. Bu peptidlerden, LKKISQ, LKKISQY, LKTVDQHQK, TVDQHQK ve VDQHQK kazosidinin parçalanma ürünleridir. Diğer taraftan, Veljovic ve ark. (2009) enterokoklara ait hücre dışı proteinazların α_{s2}-KN'in hidrolizinde rol almadığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu suşlardan özellikle *L. paracasei, Lc. lactis, L. brevis* ve *L. plantarum*'a ait proteolitik enzimlerin Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrolizinden sorumlu olduğu düşünebilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 60. ve 90. gününden sonra α_{s2}-KN türevli peptid sayısında artış gözlemlenmiş olup en yüksek sayı olgunlaşma süresinin sonunda belirlenmiştir. AWPQY peptidi yalnızca olgunlaşmanın 7. gününde gözlemlenmiştir. Bu peptidin tamamen kaybolması muhtemelen plazmin aktivitesinden kaynaklanmış olabilir (Fox ve McSweeney, 1996). Bununla birlikte, KPWTQPK peptidi olgunlaşması süresinin 30. gününden itibaren tüm olgunlaşma sürelerinde tespit edilmiştir. AGPFTPT peptidi ise olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde saptanmıştır. Diğer günlerden farklı olarak olgunlaşma süresinin sonunda ise NMAIHPR, WTQPK, VAPEEIK ve EESAEVAPEE peptidlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi, WTQPK peptidinin prolidaz aktivitesine bağlı olarak KPWTQPK peptidinden meydana geldiği görülmektedir. Olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra meydana gelen yeni peptidlerin büyük bir çoğunluğunun mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresince daha fazla artış göstermiştir. Bu durum, farklı yörelere ait tulum peynirlerinin farklı mikrobiyotaya ve dolayısıyla farklı mikrobiyal enzim çeşitliliğine sahip olmasından kaynaklanmış olabilir.

Gómez-Ruiz ve ark. (2007) geleneksel Manchego peynirlerinin olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda daha fazla α_{s2}-KN türevli peptidin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde daha az α_{s2}-KN türevli peptid bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak α_{s2}-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, yoğun düzeyde gerçekleşen enzimatik aktive sonucu bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması ve bazılarının ise farklı proteolitik enzimlerle hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli peptid sayısı, α_{s1}- ve β-KN türevli peptid sayısı kadar artış göstermemiştir. Bu

durum, α_{s2}-KN'in diğer kazeinlere kıyasla Mut yöresine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı direncini göstermektedir. α_{s2}-KN'indeki disülfit bağlarının proteolitik enzimlere karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığı bildirilmiştir (Bhat ve ark., 2016). α_{s2}-KN'inin plazmin aktivitesine çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996). Ayrıca, Katepsin D'nin de peynirde α_{s2}-KN'nin hidrolizinde etkili olduğu bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2001). Plazmin aktivitesinin pH 5.0-5.2 aralığında peynirde sınırlı olduğu (Larsson ve ark., 2006) ve katepsin D'nin optimum aktiviteyi pH 4.0'te gösterdiği (McSweeney ve ark., 1995) göz önünde bulundurulduğunda, olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin pH değerinin 4.80-5.08 arasında olmasının plazmin ve katepsin D aktivitesini sınırlandırdığı düşünülmektedir. Ayrıca, peynirlerin su aktivitesinin, mineral ve tuz içeriklerinin de bu enzimler üzerinde etkili olduğu öngörülmektedir (Gagnaire ve ark., 2001).

4.3.2.3. β-kazein türevli peptidler

β-kazeinin plazmin etkisine bağlı olarak peynirlerde yüksek oranda hidrolize olduğu ve kimozin ile hidrolizinin çok sınırlı olduğu bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017; Taivosalo ve ark., 2018). β-kazeinin, diğer kazeinlere göre oldukça hidrofobik olması nedeniyle moleküller arası hidrofobik interaksiyonların kimozine hassas bağların kimozin tarafından erişimini engelleyebileceği bildirilmiştir (Fox ve ark., 2017). Møller ve ark. (2012) sığır kimozinin β-kazeini sınırlı ölçüde hidrolize ettiğini ve C terminal bölgesinde bulunan lizin-serin, glutamin-serin, alanin-fenilalanin ve lösin-tirozin bağlarını parçaladığını tespit etmiştir. Ancak, bu araştırmacılar tarafından belirlenen β-kazein türevli peptidler Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmemiştir. Plazminin ise kazeinlerde lizin (K) ve arjinin (R) amino asitleri bulunan bağlarda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Plazmin aktivitesi sonucunda çoğunlukla uzun amino asit zincirli β-kazein türevli peptidlerin oluştuğu bildirilmiştir (Dalsgaard ve ark., 2008). Egito ve ark. (2003) plazminin β-kazeini N terminal bölgesinden hidrolize ettiğini bildirmiştir. Dolasıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-kazeinin N terminal bölgesinden belirlenen peptidler plazmin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir (Çizelge 4.21.).

Çizelge 4.21. Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	4.231	755.3942	β-KN (62-67)	Ovine	DKIHPF	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)	*	*	*	*	*
2	4.383	646.2803	β-KN (17-21)	Ovine	EQEEL	-	-		*	*	*	*
3	6.705	839.4698	β-KN (116-122)	Ovine	TMVPKHK	-	-					*
4	7.393	939.5487	β-KN (37-44)	Ovine	SITHINKK	-	-					*
5	8.843	608.3273	β-KN (62-66)	Ovine	DKIHP	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)					*
6	9.606	626.4121	β-KN (109-114)	Ovine	GVPKVK	ACE inhibitörü	Papadimitriou ve ark. (2007)					*
7	10.904	755.4534	β-KN (109-115)	Ovine	GVPKVKE	ACE inhibitörü	Papadimitriou ve ark. (2007)	*	*	*	*	*
8	11.591	760.3250	β-KN (17-22)	Ovine	EQEELN	-	-					*
9	12.736	663.3907	β-KN (44-48)	Ovine	KIEKF	-	-					*
10	13.042	733.3124	β-KN (56-61)	Ovine	TEDELQ	-	-					*
11	13.347	616.3178	β-KN (68-73)	Ovine	AQAQSL	-	-					*
12	14.185	731.3676	β-KN (23-29)	Ovine	VVGETVE	-	-					*
13	14.643	1311.7561	β-KN (109-120)	Ovine	GVPKVKETMVPK	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)					*
14	14.795	1100.5594	β-KN (195-204)	Caprine	HQPPQPLSPT	-	-					*
15	14.871	602.3262	β-KN (144-148)	Ovine	DVEKL	-	-					*
16	15.100	978.5113	β-KN (59-66)	Ovine	ELQDKIHP	ACE inhibitörü	van Elswijk ve ark. (2003)					*
17	15.176	640.3673	β-KN (63-67)	Ovine	KIHPF	Antioksidan, antibakteriyal	De Gobba ve ark. (2014); Losito ve ark. (2006)					*
18	15.557	597.3115	β-KN (78-83)	Ovine	TGPIPN	ACE inhibitörü	Geerlings ve ark. (2006)					*
19	15.709	1240.6206	β-KN (62-72)	Ovine	DKIHPFAQAQS	-	-					*
20	15.938	1309.7188	β-KN (226-236)	Caprine	KVVPQRDMPIQ	-	-					*
21	18.608	632.3151	β-KN (102-106)	Ovine	FLQPE	-	-				*	*
22	18.760	1174.7105	β-KN (185-195)	Ovine	VLPVPQKAVPQ	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2018)					*
23	18.954	1815.0671	β-KN (179-195)	Ovine	SLSQPKVLPVPQKAVPQ	-	-		*	*		
24	18.989	996.5367	β-KN (60-67)	Ovine	LQDKIHPF	-	-		*	*	*	*
25	19.371	1091.6359	β-KN (181-190)	Ovine	SQPKVLPVPQ	-	-					*
26	19.524	1728.0341	β-KN (180-195)	Ovine	LSQPKVLPVPQKAVPQ	-	-					*
27	19.469	1642.9751	β-KN (216-230)	Caprine	SQPKVLPVPQKVVPQ	-	-				*	
28	19.752	651.3956	β-KN (185-190)	Ovine	VLPVPQ	-	-				*	*
29	20.079	744.3798	β-KN (77-83)	Ovine	FTGPIPN	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)		*	*	*	*
30	20.515	1125.5830	β-KN (59-67)	Ovine	ELQDKIHPF	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)	*	*	*	*	*

31	20.993	1843.1003	β-KN (214-230)	Caprine	SLSQPKVLPVPQKVVPQ	-	-	*					
32	21.202	1204.7201	β-KN (180-190)	Ovine	LSQPKVLPVPQ	-	-					*	*
33	21.279	575.3434	β-KN (149-153)	Ovine	HLPLP	ACE inhibitörü	Sánchez-Rivera ve ark. (2016)						*
34	21.431	1291.7487	β-KN (179-190)	Ovine	SLSQPKVLPVPQ	-	-	*	*	*	*	*	
35	21.737	631.3326	β-KN (154-158)	Ovine	LVQSW	-	-						*
36	22.042	841.4337	β-KN (76-83)	Ovine	PFTGPIPN	-	-			*	*	*	*
37	22.119	577.3093	β-KN (72-76)	Ovine	SLVYP	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)	*	*	*	*	*	
38	22.195	1240.6072	β-KN (58-67)	Ovine	DELQDKIHPF	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*	*	*	
39	22.730	587.2933	β-KN (130-134)	Ovine	PVEPF	-	-	*	*	*	*	*	
40	22.897	630.3360	β-KN (77-82)	Ovine	FTGPIP	-	-					*	*
41	23.126	1163.6886	β-KN (179-189)	Ovine	SLSQPKVLPVP	-	-						*
42	23.583	940.5484	β-KN (210-218)	Ovine	VLGPVRGPF	-	-						*
43	23.725	23.725	β-KN (211-219)	Ovine	LGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)					*	*
44	24.641	1037.6011	β-KN (210-219)	Ovine	VLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007); Miguel ve ark. (2006)			*	*	*	*
45	25.411	1294.7005	β-KN (207-218)	Ovine	QEPVLGPVRGPF	İmmünomodülatör	Pisanu ve ark. (2015)						*
46	25.488	1166.6461	β-KN (208-218)	Ovine	EPVLGPVRGPF	-	-						*
47	25.557	938.5369	β-KN (212-220)	Ovine	GPVRGPFPI	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)					*	*
48	25.791	1030.5895	β-KN (140-148)	Ovine	LTLTDVEKL	-	-	*					
49	25.863	1245.6802	β-KN (138-148)	Ovine	QSLTLTDVEKL	-	-	*	*	*	*	*	
50	25.945	1391.7541	β-KN (207-219)	Ovine	QEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)	*	*	*	*	*	
51	26.016	793.4689	β-KN (86-92)	Ovine	PQNILPL	-	-					*	*
52	26.173	1263.6966	β-KN (208-219)	Ovine	EPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)					*	*
53	26.402	1457.7731	β-KN (206-218)	Ovine	YQEPVLGPVRGPF	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)			*	*	*	*
54	26.552	688.4299	β-KN (148-153)	Ovine	LHLPLP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007)	*	*	*	*	*	
55	26.707	529.2911	β-KN (216-220)	Ovine	GPFPI	Katepsin B inhibitörü	Lee ve Lee (2000)					*	*
56	26.783	1554.8126	β-KN (206-219)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFP	-	-	*	*	*	*	*	
57	27.010	1156.7371	β-KN (147-156)	Ovine	KLHLPLPLVQ	-	-			*	*	*	
58	27.316	656.3899	β-KN (97-102)	Ovine	VVVPPF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2009)					*	*
59	27.545	1051.6178	β-KN (211-220)	Ovine	LGPVRGPFPI	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017a)					*	*
60	27.849	1667.9067	β-KN (205-219)	Ovine	LYQEPVLGPVRGPFP	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017a)					*	*
61	28.154	1150.6873	β-KN (210-220)	Ovine	VLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*	
62	28.311	696.4148	β-KN (87-92)	Ovine	QNILPL	-	-					*	*

63	28.553	568.3573	β-KN (88-92)	Ovine	NILPL	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)			*		
64	28.764	1083.5941	β-KN (93-102)	Ovine	TQTPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015)	*	*	*	*	
65	28.992	1499.8711	β-KN (144-156)	Ovine	DVEKLHLPLPLVQ	-	-					*
66	29.069	1372.8301	β-KN (89-101)	Ovine	ILPLTQTPVVVPP	-	-	*	*	*	*	
67	29.145	1504.8375	β-KN (207-220)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*
68	29.150	854.4901	β-KN (95-102)	Ovine	TPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015)				*	*
69	29.220	637.3472	β-KN (73-77)	Ovine	LVYPF	-	-	*	*	*	*	*
70	29.373	1376.7761	β-KN (208-220)	Ovine	EPVLGPVRGPFPI	İmmünomodülatör	Kruzel (2011)	*	*	*	*	*
71	29.449	1028.6399	β-KN (148-156)	Ovine	LHLPLPLVQ	-	-			*	*	*
72	29.836	1780.9914	β-KN (204-219)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
73	29.678	551.3684	β-KN (150-154)	Ovine	LPLPL	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)				*	*
74	29.754	1667.9046	β-KN (206-220)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPI	Antibakteriyal	Birkemo ve ark. (2009)	*	*	*	*	*
75	30.211	801.5121	β-KN (148-154)	Ovine	LHLPLPL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)				*	*
76	30.364	2403.3705	β-KN (93-114)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-		*	*	*	*
77	30.438	1188.6661	β-KN (149-158)	Ovine	HLPLPLVQSW	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*				
78	30.981	1164.7014	β-KN (211-221)	Ovine	LGPVRGPFPIL	-	-					*
79	31.057	1550.8338	β-KN (93-106)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPE	Antioksidan	Farvin ve ark. (2010)	*	*	*	*	*
80	30.744	1780.9887	β-KN (205-220)	Ovine	LYQEPVLGPVRGPFPI	Antioksidan	Ha ve ark. (2015)			*	*	*
81	31.057	1449.7852	β-KN (94-106)	Ovine	QTPVVVPPFLQPE	-	-				*	*
82	31.515	1263.7695	β-KN (210-221)	Ovine	VLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*
83	31.430	1421.7944	β-KN (93-105)	Ovine	TQTPVVVPPFLQP	-	-	*	*	*	*	*
84	31.591	587.3673	β-KN (218-222)	Ovine	FPILV	-	-					*
85	31.735	1617.9260	β-KN (207-221)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*
86	31.897	1663.9267	β-KN (92-106)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici, antiamnezik	Ohsawa ve ark. (2013)					*
87	32.116	1894.0720	β-KN (204-220)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPI	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
88	32.126	1192.6846	β-KN (95-105)	Ovine	TPVVVPPFLQP	ACE inhibitörü	Abubakar ve ark. (1998)				*	*
89	32.344	1780.9891	β-KN (206-221)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPIL	Hiperkolesterolemi önleyici, antioksidan	Mahdi ve ark. (2017) Mahdi ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
90	32.431	1489.8653	β-KN (208-221)	Ovine	EPVLGPVRGPFPIL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)		*	*	*	*
91	32.573	769.4753	β-KN (97-103)	Ovine	VVVPPFL	-	-					*
92	32.802	1196.6783	β-KN (93-103)	Ovine	TQTPVVVPPFL	-	-	*	*	*	*	*
93	33.194	1716.9871	β-KN (207-222)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPILV	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)					*
94	33.423	1701.0095	β-KN (140-154)	Ovine	LTLTDVEKLHLPLPL	-	-					*
95	33.499	1301.7465	β-KN (148-158)	Ovine	LHLPLPLVQSW	-	-					*

96	33.652	1880.0615	β-KN (206-222)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPILV	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)						*
97	34.033	866.5277	β-KN (96-103)	Ovine	PVVVPPFL	-	-						*
98	34.097	1333.7667	β-KN (96-107)	Ovine	PVVVPPFLQPEI	-	-						*
99	34.249	1519.8991	β-KN (89-102)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPF	-	-	*	*	*	*	*
100	34.554	2201.2508	β-KN (140-158)	Ovine	LTLTDVEKLHLPLPLVQSW	-	-	*	*	*	*	*
101	34.630	1794.9578	β-KN (93-108)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIM	ACE inhibitörü	Pisanu ve ark. (2015)	*	*	*	*	*
102	35.011	1633.9463	β-KN (88-102)	Ovine	NILPLTQTPVVVPPF	-	-		*	*	*	*
103	35.406	1987.1388	β-KN (89-106)	Ovine	LPLTQTPVVVPPFLQPE	-	-		*	*	*	*
104	36.020	1858.1020	β-KN (89-105)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQP	-	-			*		
105	36.611	2100.2278	β-KN (89-107)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEI	-	-			*	*	*
106	36.687	1632.9876	β-KN (89-103)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFL	-	-		*	*	*	*
107	37.008	2231.2690	β-KN (89-108)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEIM	-	-		*	*	*	*
Toplam								**32**	**43**	**52**	**64**	**97**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: XP_010804480, XP_005681778, CAA34502). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, İmmünnomodülatör: bağışıklık sistemini düzenleyici, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, Antiamnezik: unutkanlık önleyici, Hiperkolesterolomi önleyici: kolesterol düşürücü, Katepsin B: patolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Ayrıca, sütün doğal enzimi olan katepsin D'nin de β-kazein üzerinde aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Hurley ve ark., 2000). Larsen ve ark. (1996) katepsin D enziminin β-kazeine 13 farklı bölgeden etki ettiğini ve bu bölgelerin çoğunlukla β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan lösin (L), fenilalanin (F), triptofan (W) ve serin (S) amino asitlerine ait bağlardan oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu enzimlere ek olarak, peynirlerin olgunlaşma süresince mikrobiyal proteolitik enzimler de β-kazeinin ileri derecede hidrolizinde görev alabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2013; Bounouala ve ark., 2017; Solieri ve ark., 2018). Peynirde koagülant veya doğal enzimlerin aktivitesi ile meydana gelen uzun veya orta büyüklükteki peptidler mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalanırken, oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996; Ardö ve ark., 2017).

Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.21.'de sunulmaktadır. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 107 çeşit β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu değer, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlerin sayısından oldukça yüksektir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla β-KN türevli peptid belirlenmiştir. Bu durumun, peynirlerindeki aktif proteolitik sisteminin farklılığından kaynakladığı düşünülmektedir. Proteolitik sistemdeki farklılıklara peynir üretiminde kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonu, koagülant çeşidi ve miktarı, aktif peynir mikrobiyotası ve üretim metodu ile ilgili farklılıklar neden olmuş olabilir.

Fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) koagülant ve termofilik laktik asit bakterileri ve propiyonik asit bakterilerinden oluşan starterler kullanılarak üretilen Emmental peynirinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 28 çeşit (Gagnaire ve ark., 2001), rennet, *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) starter kültürleri kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra 17 çeşit (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), çiğ koyun sütü kullanılarak üretilen Idiazabal peynirlerinin 4 ay olgunlaştırılmasından sonra 65 çeşit (Sagardia ve ark., 2013) ve kimozin kullanılarak çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde 74 çeşit (Fontenele ve ark., 2017) β-KN türevli peptid belirlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinin 6 ay olgunlaşma süresince belirlenen β-KN türevli peptid sayısı Emmental, Manchego, Coalho ve

Idiazabal peynirlerinde belirlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Peynir üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda β-KN türevli peptid sayısında veya çeşidinde gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem uygulanıp uygulanmamasına, koagülant miktarına ve çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve olgunlaşma süresince farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Losito ve ark. (2006) çeşitli İtalyan peynirlerinin üretiminde farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda farklı β-KN türevli peptidlerin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Pisanu ve ark. (2015) pastörize süt kullanılarak üretilen peynirlerde çiğ sütten üretilen peynirlere kıyasla daha az β-KN türevli peptidin bulunduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli GPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFP, LYQEPVLGPVRGPFP, LLYQEPVLGPVRGPFP, TPVVVPPF, TPVVVPPFLQP, DKIHPF, LQDKIHPF ve DELQDKIHPF peptidleri sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin 41 gün olgunlaşma süresince de tanımlanmıştır (Sadat-Mekmene ve ark., 2013). Ayrıca, Coalho peynirinde gözlemlenen β-KN türevli ELQDKIHPF, ELQDKIHP, YQEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPI, LLYQEPVLGPVRGPFPI ve LYQEPVLGPVRGPFPI peptidleri Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de tespit edilmiştir (Fontenele ve ark., 2017). Bununla birlikte, 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde belirlenen DKIHPF, DKIHP, SLSQPKVLPVPQ, LPLPL, VLGPVRGPFP ve GPVRGPFPI peptidlerine de Mut yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır (Gómez-Ruiz ve ark., 2004). Canestrato Pugliese peynirinde belirlenen ELQDKIHPF ve KIHPF peptidleri ve Caprino del Piemonte peynirinde belirlenen NILPL, LHLPLP ve GPVRGPFPI peptidleri de Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir (Losito ve ark., 2006). Diğer taraftan, peynir üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar arasında Mut yöresine ait tulum peynirleri ile en fazla ortak β-KN türevli peptidler (20 adet) Idiazabal peynirinde belirlenmiştir (Sagardia ve ark., 2013). Bu ortak peptidler; LLYQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPI,

YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPF, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, LGPVRGPFPIL, GPVRGPFPI, SLSQPKVLPVPQ, LSQPKVLPVPQ ve PFTGPIPN peptidlerinden oluşmaktadır. Ancak, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan diğer β-KN türevli peptidler (meydana gelen peptidlerin büyük bir çoğunluğu) bahsi geçen bu peynirlerde tanımlanan peptidlerden farklılık göstermektedir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde, peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (56) β-KN'in hidrofobik olan C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği ve miktar bakımından bu peptidleri β-KN'in orta (27) ve N terminal (24) bölgelerinden gelen peptidlerin takip ettiği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, α_{s2}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden oluştuğu belirlenmiştir. Plazminin β-KN'in genellikle N terminal bölgesini hidrolize ettiği göz önünde bulundurulduğunda (Egito ve ark., 2003), Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal bölgesinden meydana gelen peptidler plazmin enziminin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir. Ayrıca, sütün doğal diğer bir enzimi olan katepsin D'nin ise β-KN'in çoğunlukla C terminal bölgesini hidrolize ettiği düşünüldüğünde (Larsen ve ark., 1996), Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelen peptidler katepsin D enziminin aktivitesinden kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmaların yanı sıra Taivosalo ve ark. (2018) çeşitli laktik asit bakterilerine ait proteolitik enzimlerin β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden oluşan çeşitli bölgeleri hidrolize ettiğini rapor etmiştir. Lozo ve ark. (2011) laktobasillerde tanımlanan proteinazların özellikle β-KN'in C terminal bölgesini hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan, β-KN'in N terminal bölgesinin mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir (Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Miclo ve ark., 2012; Chang ve ark., 2013). Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden peptidlerin oluşumunda mikrobiyal proteolitik enzimler de görev almış olabilir.

β-KN türevli peptidlerin çeşitli peynirlerde farklı parçalanma bölgelerinden meydana geldiği görülmüştür. Old Saare (Taivosalo ve ark., 2018), Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2007), Emmental (Gagnaire ve ark., 2001; Sadat-Mekmene ve ark., 2013) ve Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011) peynirlerinde β-KN'in orta ve C terminal bölgelerine kıyasla N terminal bölgesinden daha yüksek sayıda β-KN türevli peptid

meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, Idiazabal (Sagardia ve ark., 2013), Coalho (Fontenele ve ark., 2017) ve keçi peynirlerinde (Sommerer ve ark., 2001) ise daha çok β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelen peptidlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Peynirlerde meydana gelen peptid modellerinde gözlemlenen bu farklılıklar aktif proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

β-KN'in ilk 21 amino asit R gruplarını içeren bölgenin hidrofilik olduğu ve bu bölgeyi takip eden bölgenin ise hidrofobik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Swaisgood, 2003). Mut yöresine ait tulum peynirlerinde, α_{s1}-KN'de olduğu gibi β-KN'in de hidrofobik bölgelerinden daha fazla parçalandığı görülmüştür. Bu durum, α_{s1}- ve β-KN'deki hidrofilik bölgelerin peynirde mevcut proteolitik enzimlere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde, β-KN'in hidrofobik bölgesinden 105 peptid, hidrofilik bölgesinden 1 peptid, β-KN (17-21), ve hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgeleri içeren 1 peptid, β-KN (17-22), tanımlanmıştır. Hidrofobik bölgeden meydana gelen β-KN türevli peptidlerin 23-222 amino asitleri arasında bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde, Sadat-Mekmene ve ark. (2011) tarafından β-KN'in 28-207 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara, Miclo ve ark. (2012) tarafından β-KN'in 57-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara ve Chang ve ark. (2013) tarafından β-KN'in 127-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *B. longum*'a ait proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha hassas olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmalardan mikrobiyal proteolitik enzimlerin daha çok β-KN'in hidrofobik bölgelerini etkilediği görülmektedir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan β-KN türevli peptidlerin 5-22 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha çok sayıda uzun zincirli β-KN türevli peptidler belirlenmiştir. Bu durumun, peynirdeki proteolitik enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN'ler üzerinde farklı aktivite göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de uzun peptidlerin, genellikle β-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, β-KN'in N terminal bölgesinden daha kısa zincirli peptidlerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Gagnaire ve ark. (2001) tarafından 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 3-20, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) tarafından 8 ay

olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 5-12, Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 9-24, Sagardia ve ark. (2013) tarafından 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirlerinde 7-26 amino asit uzunluğuna sahip β-KN türevli peptidlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptidlerde pentapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu sırasıyla 11 ve 6 amino asit dizilimlerinden oluşan peptidlerin takip ettiği görülmüştür. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) da 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde β-KN türevli pentapeptidlerin baskın olduğunu belirlemişlerdir.

β-KN'in parçalanması sonucu antibakteriyal özellikli kazesidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI) ve kazesidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV-sığır, YQEPVLGPVRGPFPILV-koyun ve keçi) peptidlerinin oluştuğu bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009). β-KN türevli kazesidin 15 ve kazesidin 17 peptidlerine 180 günlük olgunlaşma süresince Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca bu peptidlerin parçalanma ürünü olan 22 peptidin daha bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler; YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPF, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPF, VLGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, VLGPVRGPF, LGPVRGPFPIL, LGPVRGPFPI, LGPVRGPFP, GPVRGPFPI, GPFPI ve FPILV sekanslarından oluşmaktadır. Kazesidin 15 ve 17'nin parçalanma ürünleri olan bu peptidlerin karboksipeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz (Glu-Pro) ve endopeptidaz aktivitelerine bağlı olarak meydana geldiği görülmektedir. Bu enzimlerin, peynirlerin mikrobiyotasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde kazesidin türevli peptid sayısı Anamur yöresine ait tulum peynirlerinkinden yüksek bulunmuştur. Bu durum, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde farklı kazesidin türevli peptidlerin oluştuğunu göstermektedir.

Meisel ve Bockelmann (1999) çeşitli mikrobiyal hücre duvarı ilişkili proteinazlar ile β-KN'in parçalanması sonucu antihipertansif beta kazokinin 7 (AVPYPQR) ve 10 (YQQPVLGPVR) peptidlerinin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak, β-KN türevli bu peptidlere Mut yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmamıştır. Ayrıca, β-KN'in parçalanması sonucu opioid özellikli β-kazomorfinlerin meydana geldiği rapor edilmiştir (Jinsmaa ve Yoshikawa, 1999; Nguyen ve ark., 2015). Bu opioid peptidler arasından β-kazomorfin 7'nin (YPFPGPI) tip I diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırdığı

için insan hastalıklarının gelişiminde bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (Nguyen ve ark., 2015). Nitekim, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde herhangi bir beta kazomorfin türevli peptid gözlemlenmemiştir.

Demirci (2019) 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinde *E. faecium* ve *L. plantarum* suşlarının baskın olarak bulunduğunu ve bu olgunlaşma süresince *E. faecalis, E.hirae, E. durans, Lc. lactis, L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının da yer aldığını bildirmiştir. Bu mikrobiyotaya ait enzimlerin Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in türevli peptidlerin oluşumunda önemli bir paya sahip olduğu düşünülmektedir. Çizelge 4.21. incelendiğinde, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen çoğu β-KN türevli peptidin karboksipeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz ve endopeptidaz aktivitesi sonucu meydana geldiği görülmektedir. Bu enzimlerin, tulum peynirin mikrobiyotasından kaynaklandığı öngörülmektedir. Theriot ve ark. (2009) bir dipeptidaz olan mikrobiyal prolidazların sonunda prolin bulunan dipeptidleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *L. paracasei* suşlarının yüksek düzeyde prolidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Christensen ve ark. (1999) *Lc. lactis* suşlarının da prolidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, *L. paracasei* ve *Lc. lactis* suşlarına ait prolidaz enzimlerinin EPVLGPVRGPFPIL peptidinin EP dipeptidi üzerindeki aktivitesine bağlı olarak beta kazesidin türevli VLGPVRGPFPIL peptidi meydana gelmiş olabilir.

Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi sonucu β-KN türevli TQTPVVVPPF, VVVPPF, FTGPIPN, LHLPLP ve LLYQEPVLGPVRGPFP peptidlerini meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile FTGPIPN, LLYQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFPILV, LHLPLPL ve TPVVVPPF peptidlerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. β-KN türevli tüm bu peptidler, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Requena ve ark. (1993) geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının hücre duvarı ilişkili proteinaz aktivitesinin α_{s1}-KN'e kıyasla daha çok β-KN üzerinde gerçekleştiğini ve *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar ilgili suşlar arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini ise *L. plantarum* suşlarında belirlemişlerdir. Ayrıca, Igoumenidou ve ark. (2005) Feta peynirinden izole edilen *E. durans* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'e kıyasla β-KN'i daha hızlı hidrolize ettiğini

bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Veljovic ve ark. (2009) *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre dışı proteinazların β-KN üzerinde çok yüksek veya orta derecede aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Quirós ve ark. (2007) ve Gútiez ve ark. (2013) *E. faecalis* suşları ile fermente edilen sütlerde β-KN türevli VLGPVRGPFP, VVVPPF, LHLPLP ve LHLPLPL peptidlerinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu peptidlere Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir.

Herreros ve ark. (2003) İspanyol Armada peynirinden izole edilen *L. plantarum* ve *L. brevis* suşlarına ait proteolitik enzimlerin alanin, lizin ve lösin bağları üzerinde yüksek düzeyde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis* suşuna ait hücre içi proteolitik enzimlerin alanin ve arjinin bağlarında aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlerken, *L. paracasei* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin ise valin, alanin ve arjinin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, González ve ark. (2010) İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin lizin, lösin, alanin ve prolin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin ise alanin, lösin ve lizin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda lösin, valin, prolin bağlarında gözlemlenen aminopeptidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir.

İspanyol Armada peynirinden izole edilen *Lc. lactis* ve *L. brevis* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerinin C terminalinde bulunan lösin amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği ve bu amino asit üzerinde *Lc. lactis*'e ait enzimlerin daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Herreros ve ark., 2003). Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis, L. paracasei* ve *E. faecium* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin arjinin ve fenilalanin bağlarında karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğu ve bu suşlar arasında en yüksek karboksipeptidaz aktivitesini *E. faecium* suşunun gösterdiği tespit edilmiştir (Macedo ve ark., 2000). İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 ve *E. faecalis* GE 2320 suşlarının *Leu. mesenteroides, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla C terminalinde bulunan lösin amino asidine karşı daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (González ve ark., 2010). Aynı araştırmacılar, *Lc.*

lactis GE 2363 suşunun *L. plantarum, L. paracasei* ve *E. faecalis* suşlarına kıyasla daha yüksek dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda lösin ve fenilalanin bağlarında gözlemlenen karboksipeptidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak gerçekleşen proteoliz ile önemli ölçüde artış göstermiştir. Olgunlaşma süresinin başında 32 β-KN türevli peptid belirlenirken, 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise 97 β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin sonunda β-KN türevli peptid sayısı çok daha fazla artmıştır. Bu durum, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha aktif bir proteolitik sistemin bulunduğunu işaret etmektedir. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde 8 aylık olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid sayısında artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Taivosalo ve ark. (2018) mikrobiyal rennet ve starter kültürler (mezofilik ve termofilik) kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Old Saare peynirlerinde β-KN türevli peptid miktarının olgunlaşma süresinin 3. ayına kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 8. ayına kadar azaldığını, ancak, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 8. ayında daha yüksek miktarda β-KN türevli peptid bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) sıvı buzağı renneti ve *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik starter bakteriler kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 13. gününe kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 40. gününde azaldığını bildirmişlerdir, ancak, olgunlaşma süresinin 40. günündeki peptid sayısı olgunlaşma süresinin başından yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, pıhtısı haşlanan Ragusano peynirinde gerçekleştirilen bir çalışmada ilerleyen olgunlaşma süresi ile birlikte β-KN türevli peptid sayısının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Gagnaire ve ark., 2011). Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak β-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması, bazı peptidlerin peynirde birikmesi ve bazılarının ise hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 107 farklı çeşitte β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 26 peptidin, DKIHPF, GVPKVKE, DELQDKIHPF, SLSQPKVLPVPQ, SLVYP, LVYPF, PVEPF, QSLTLTDVEKL, LLYQEPVLGPVRGPFPI, LLYQEPVLGPVRGPFP,

YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, ILPLTQTPVVVPPF, TQTPVVVPPFLQPEIM, TQTPVVVPPFLQPE, TQTPVVVPPFLQP, TQTPVVVPPFL, LTLTDVEKLHLPLPLVQSW ve LHLPLP, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerin arasında kazesidin 15 peptidinin de bulunduğu görülmektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde, Anamur yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla daha fazla korunmuş peptid tespit edilmiştir. Bu durum, β-KN türevli peptid sayısının Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla olmasıyla ilişkilendirilebilir. Olgunlaşma süresinin farklı günlerinde korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de belirlenmiştir ve bu peptidlerin olgunlaşma süresince devamlı tespit edilmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in C terminal bölgesinden (16 adet) meydana geldiği, diğerlerinin ise β-KN'in orta (6 adet) ve N terminal (5 adet) bölgelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen bu korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (23 adet) nötral ve hidrofobik amino asitlerle bittiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde β-KN (62-67) (DKIHPF), β-KN (73-76) (LVYP), β-KN (93-102) (TQTPVVVPPF), β-KN (148-153) (LHLPLP) ve β-KN (208-219) (EPVLGPVRGPFP) sekanslarını içeren korunmuş bölgelerin de bulunduğu fark edilmiştir. Taivosalo ve ark. (2018) Old Saare peynirinin 8 aylık olgunlaşma süresi boyunca genellikle β-KN türevli fosfopeptidlerin biriktiğini yani korunduğunu tespit etmişlerdir. Chalmers ve ark. (2004) proteinlerde fosforilizasyonun protein kinaz enzimi vasıtasıyla serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitlerine fosfat grubunun eklenmesiyle meydana geldiğini bildirmişlerdir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde fosfopeptidler ayrıca belirlenmemiştir, ancak, olgunlaşma süresince korunmuş β-KN türevli peptidlerin bazılarında serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitleri görülmüştür. Dolayısıyla, bu peptidlerde de fosforilizasyon meydana gelmiş olabilir.

Biyoaktif peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda (Hartmann ve Meisel, 2007), Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin biyoaktif özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen β-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu

güçlendirici ve antiamnezik olmak üzere 9 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla β-KN türevli peptidlerde daha çeşitli biyolojik aktivite görülmüştür. Biyolojik aktivite gösteren peptidler arasında en fazla ACE inhibitörü peptidlere rastlanmış olup bunu sırasıyla antioksidan ve antibakteriyal peptidler takip etmiştir.

β-KN türevli 29 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir. β-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısı α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısından daha yüksek bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile farklı ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği Çizelge 4.21.'den de görülmektedir. Mut yöresinde belirlenen β-KN türevli antihipertansif peptidler; DKIHPF, DKIHP, GVPKVKETMVPK, GVPKVKE, GVPKVK, DELQDKIHPF, ELQDKIHPF, ELQDKIHP, FTGPIPN, TGPIPN, VLPVPQKAVPQ, SLVYP, HLPLPLVQSW, LHLPLPL, LHLPLP, HLPLP, LLYQEPVLGPVRGPFPI, LLYQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFPILV, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFP, LGPVRGPFP, TQTPVVVPPFLQPEIM, TPVVVPPFLQP ve VVVPPF peptidlerinden oluşmaktadır. Antihipertansif bu peptidlerin çoğunluğu β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelmiştir. Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların etkisiyle meydana gelen LHLPLPL, LHLPLP, VVVPPF, FTGPIPN, LLYQEPVLGPVRGPFPI, LLYQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPILV ve QEPVLGPVRGPFPILV peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Quirós ve ark. (2009) VVVPPF peptidinin >1 mg/mL IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Villegas ve ark. (2014) QEPVLGPVRGPFP peptidinin %98.61 ACE inhibisyonu gösterdiğini bildirmiştir. Quirós ve ark. (2007) ise VLGPVRGPFP peptidinin 137 μM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik fenilalanin amino asidi bulunan peptidlerin prolin amino asidi bulunduranlara kıyasla daha düşük ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonunda prolin ve fenilalanin amino asitlerini bulunduran β-KN türevli ACE inhibitörü peptidler Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. ACE inhibitörü özellik gösteren biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin 22 tanesinde fenilalanin (F), izolösin (I), lösin

(L), valin (V), metiyonin (M) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, HLPLPLVQSW peptidi haricindeki diğer ACE inhibitörü peptidlerin C terminal ucundaki son üç amino asitten birinin hidrofobik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, ACE inhibitörü peptidlerin prolin, lizin ve aromatik amino asitleri (fenilalanin, triptofan ve tirozin) içerdiği bildirilmiştir (Suetsuna ve Nakano, 2000; Aslam ve ark., 2019). Mut yöresinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin lizin, prolin, aromatik fenilalanin, triptofan ve tirozin amino asitlerini içerdiği gözlemlenmiştir.

YQEPVLGPVRGPFPIL peptidinin hiperkolesterolemi önleyici ve antioksidan özelliklere sahip multifonksiyonel bir peptid olduğu belirlenmiştir (Mahdi ve ark., 2017; Mahdi ve ark., 2018). Bu peptid, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tüm olgunlaşma süresi boyunca tespit edilmiştir. Gene olgunlaşma süresinin tümünde gözlemlenen antioksidan TQTPVVVPPFLQPE peptidi Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanmıştır. Bir diğer antioksidan peptid olan TQTPVVVPPF peptidine olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar rastlanmıştır. Ayrıca, olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde antioksidan TPVVVPPF peptidi ve olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde antioksidan LYQEPVLGPVRGPFPI peptidi gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, olgunlaşma süresinin son gününde hem antioksidan hem de antibakteriyal özellik gösteren KIHPF peptidinin meydana geldiği belirlenmiştir. Losito ve ark. (2006) bu peptidin *L. sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal aktivite gösterdiğini tespit etmiştir.

Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan diğer antibakteriyal peptidler olan ELQDKIHPF ve YQEPVLGPVRGPFPI peptidleri tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. ELQDKIHPF peptidinin *Lactobacillus sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Losito ve ark., 2006). YQEPVLGPVRGPFPI peptidinin ise, yani kazesidin 15 peptidinin *E. coli* DH5α, *E. coli* DPC6053 ve *Enterobacter sakazakii* DPC5120 suşlarına karşı sırasıyla 0.5, 0.4 ve >1.0 mg/mL'lik MIC değeri ile antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009). Ayrıca, yalnızca olgunlaşma süresini 60. gününde antibakteriyal NILPL peptidi tanımlanmıştır. Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde ise antibakteriyal GPVRGPFPI peptidi tespit edilmiştir. Losito ve ark. (2006) NILPL ve GPVRGPFPI peptidlerinin *Lactobacillus sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Olgunlaşma süresinin 60. gününden son gününe kadar insülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik gösteren LGPVRGPFPI ve

LYQEPVLGPVRGPFP peptidleri tanımlanmıştır. Ayrıca, olgunlaşma süresinin 90. gününde DPP-4 inhibitörü LPLPL peptidinin meydana geldiği ve bu peptidin olgunlaşma süresinin sonunda da görüldüğü tespit edilmiştir. İmmünomodülatör özellik gösteren EPVLGPVRGPFPI peptidi tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenirken, diğer bir immünomodülatör peptid olan QEPVLGPVRGPF peptidi ise yalnızca olgunlaşma süresinin sonunda belirlenmiştir. Kruzel (2011) EPVLGPVRGPFPI peptidinin immünolojik hastalıkların, özellikle astımın önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olduğunu bildirmiştir. Diğer taraftan, olgunlaşma süresinin son gününde meydana gelen LTQTPVVVPPFLQPE peptidinin unutkanlığı önlediğini ve beyin fonksiyonlarını artırdığı bildirilmiştir (Ohsawa ve ark., 2013). Ayrıca, protein düzensizliğine bağlı olarak kas gelişiminin olmaması, kemik erimesi ve tümör metastazı (yayılması) gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol alan ve lizozomal sistein proteazlardan biri olan katepsin B'yi inhibe eden (Lee ve Lee, 2000) GPFPI peptidi olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde tespit edilmiştir.

4.3.3. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri

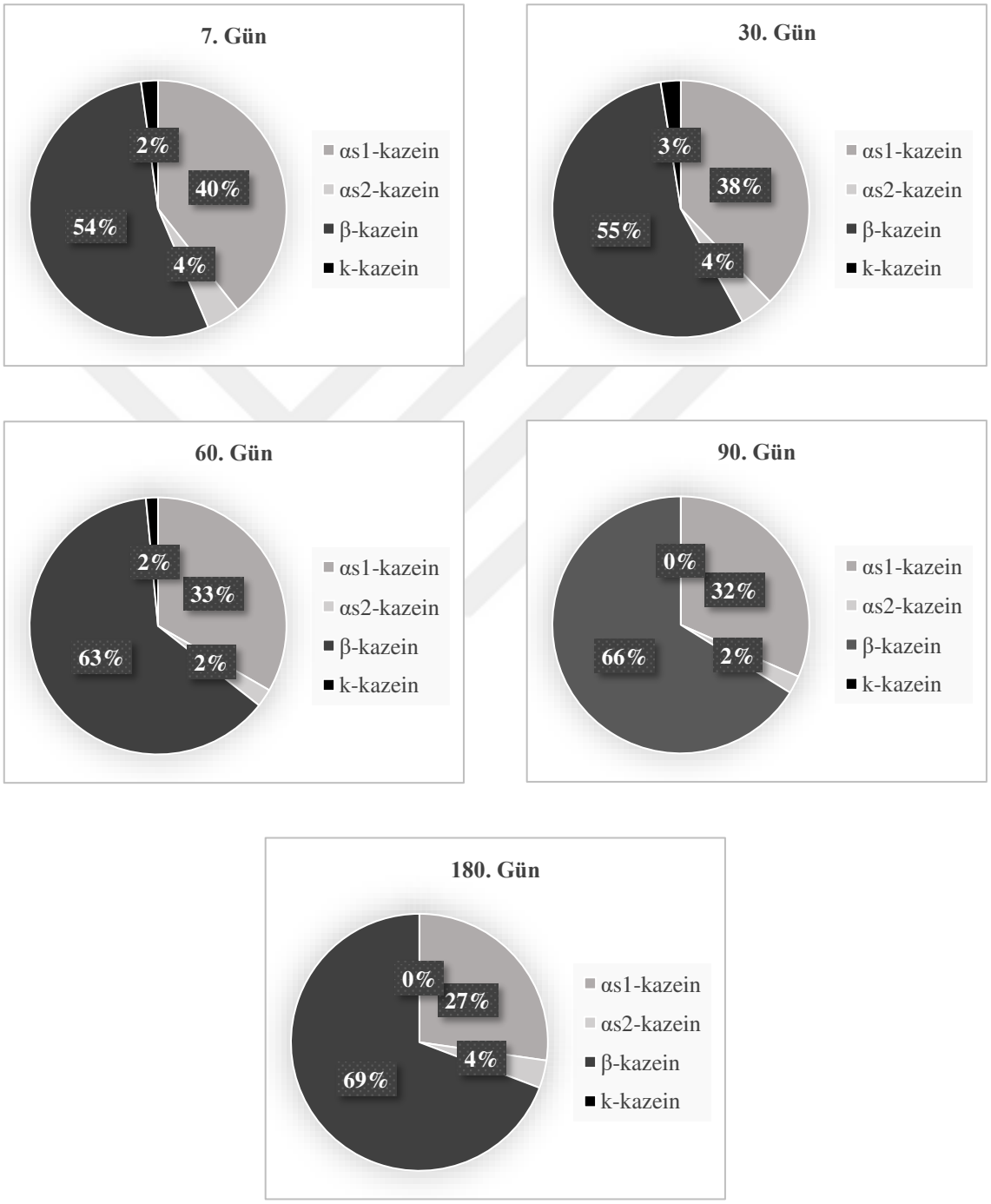
Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresince peptid dinamiğinde meydana gelen değişimi gözlemlemek amacıyla Şekil 4.19. düzenlenmiştir. Olgunlaşma süresine bağlı olarak α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein türevli peptidlerin meydana gelme oranları değerlendirilmiştir. Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin aksine Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-kazein türevli peptidlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Yöreler arasında görülen farklılığın mikrobiyal enzimlerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Fontenele ve ark. (2017) Coalho peynirinde az miktarda κ-kazein türevli peptidlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca tespit edilen en yüksekten en düşüğe peptid oranı sırasıyla β- (%54-69), α_{s1}- (%27-40), α_{s2}- (%2-4) ve κ-kazein (%0-3) türevli peptidlerde belirlenmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde en çok β-kazein türevli peptidler belirlemiş olup bunu sırasıyla α_{s1}- ve α_{s2}-kazein türevli peptidler takip etmişlerdir. Benzer şekilde, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) tarafından İsviçre tipi peynirlerde ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho

peynirinde β-kazein türevli peptidlere çok daha yüksek oranda rastlandığı ve bunu α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptidlerin izlediği bildirilmiştir.

Olgunlaşma süresi boyunca, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptid oranlarının düşük çıkması şaşırtıcı değildir. Çünkü, diğer kazeinlere kıyasla yalnızca α_{s2}- ve κ-kazeinde bulunan disülfit bağlarının proteolize karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığı bildirilmiştir (Bhat ve ark., 2016). Ayrıca, κ-kazeinin koagülant ile parçalanması sonucunda *para*-κ-kazein şeklinde az miktarda peynirde kaldığı bilinmektedir. Fontenele ve ark. (2017) kazeinlerin özellikle κ-kazeinin sıkı ve gevşek alanlara sahip olduğunu öne sürmüştür ve bu durumun proteolitik enzimlerin erişimini etkilediğini bildirmişlerdir. Bununla ilgili olarak, Farrell ve ark. (2002) κ-kazeinin 14. ve 64. amino asitleri arasındaki bölgenin sıkı bir yapıya sahip olduğunu, 105. ve 169. amino asitleri arasındaki geniş bölgenin gevşek yapıya sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Dolayısıyla gevşek bölgeye proteolitik enzimlerin etki etmesiyle κ-kazein türevli peptidler Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelmiş olabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de olgunlaşma süresince α_{s1}- ve β-kazein türevli peptidlerin oranı zıt bir seyir izlemiştir. Bu süreçte α_{s1}-kazein türevli peptid oranı %40'tan %27'ye düşerken, β-kazein türevli peptid oranı ise %54'ten %69'a çıkmıştır. Daha önceki çalışmalarda da β-kazein türevli peptidlerin daha baskın olması bu durumdan kaynaklanmış olabilir. Olgunlaşma süresince α_{s1}-kazein türevli peptid sayısı artmaktadır, ancak, β-kazein türevli peptid sayısı daha fazla arttığı için oransal olarak α_{s1}-kazein türevli peptidler azalmaktadır. Demirci (2019) Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinden farklı olarak olgunlaşma süresinin başında Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde *Lc. lactis*'in peynir ortamında baskın olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, ilgili araştırmacı olgunlaşma süresinin 30. ve 60. günlerinde *E. faecium*'un mikrobiyotaya hakim olduğunu ancak *Lc. lactis*'in de yüksek oranlarda bulunduğunu ve olgunlaşma süresinin sonunda ise *E. faecium*'un baskın hale geldiğini tespit etmiştir. Dolayısıyla, κ-kazein türevli peptidlerin de olgunlaşma süresinin ilk 60 günü gözlemlenmesi *Lc. lactis* suşları ile ilişkilendirilebilir. Reid ve ark. (1994) *Lc. lactis*'in hücre duvarı ilişkili proteinazlarının κ-kazein hidrolizi üzerinde aktif olarak görev aldığını bildirmiştir. Ayrıca, ilgili araştırmacılar *Lc. lactis*'e ait P_I tipi proteinazların özellikle β-kazein üzerinde etkili olduğu, α_{s1}-kazein üzerinde ise etkisinin çok az olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Rasouli ve ark. (2012) tarafından Lighvan peynirlerinde gerçekleştirilen üre-PAGE analizi sonuçları incelendiğinde, *E. faecium*'a

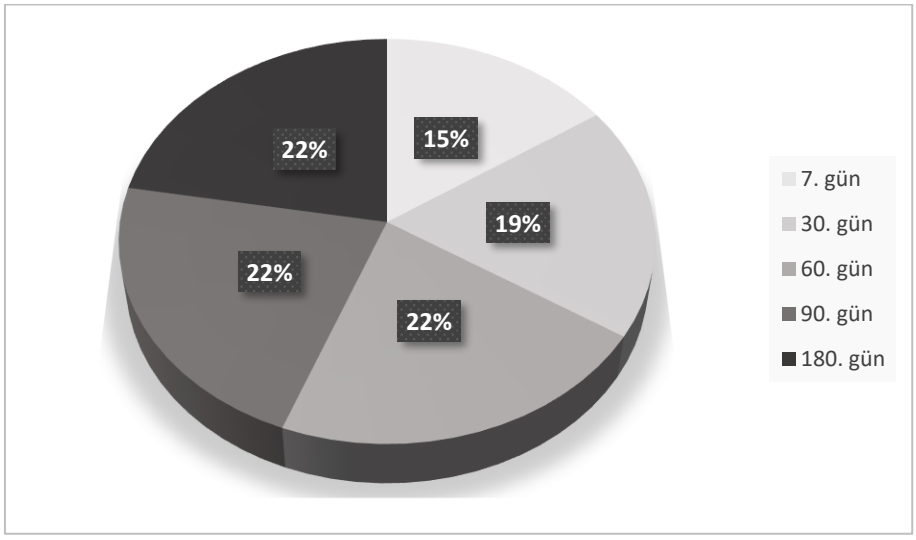
ait proteolitik enzimlerin β-kazein üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde aktif mikrobiyotaya ait enzimlerin β-kazein üzerinde daha aktif olduğu ve buna bağlı olarak β-kazein türevli peptid oranının daha yüksek olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.19. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinden peptid dinamiğinin olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Olgunlaşma süresinin 60. gününü takiben κ-kazein türevli peptidlerin görülmediği tespit edilmiştir. Bu süreçte, κ-kazein türevli peptidlerin mikrobiyal enzimlerle amino asitlere kadar ileri düzeyde parçalanmasına bağlı olarak tulum peynirinde gözlemlenmediği düşünülmektedir. α_{s2}-kazein türevli peptidlerin oranı ise olgunlaşma süresinin başına kıyasla tıpkı diğer yörelere ait tulum peynirlerinde de olduğu gibi sabit kalmıştır. Genellikle α_{s2}-kazein plazmin aktivitesine bağlı olarak parçalanmaktadır (McSweeney, 2004). Artan asitlik değerlerinin plazmin aktivitesini azalttığı göz önünde bulundurulduğunda (Larsson ve ark., 2006), bu çalışmada 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca artan asitliğin plazmin aktivitesini düşürdüğü ve dolayısıyla α_{s2}-kazein türevli peptid oranını etkilediği öngörülmektedir. Tulum peynirlerinin olgunlaşması süresince peptid dinamiğindeki en önemli rolü α_{s1}- ve β-kazeinlerin aldığı belirlenmiştir.

Fonksiyonel peptid oranının olgunlaşma süresine bağlı değişimini incelemek amacıyla Şekil 4.20 düzenlenmiştir. Genel olarak Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen peptidlerin çeşidine bağlı olarak ACE inhibitörü, antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik, GLP-1 artırıcı, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, beyin fonksiyonunu artırıcı, kolesterol düzenleyici, antienflamatuar, cilt yenileyici, opioid, katepsin B inhibitörü, metal şelatlayıcı, antiamnezik ve PEP inhibitörü olmak üzere toplam 16 farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen fonksiyonel peptid sayısının olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Olgunlaşma süresinin fonksiyonel peptid sayısı üzerinde önemli etkiye sahip olduğu görülmektedir. Özellikle olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar biyoaktif peptid oranı devamlı artış göstermiş olup, olgunlaşmanın ilerleyen günlerinde ise bu oran sabit kalmıştır. Biyoaktif özellik gösteren peptidlerin α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein türevli olduğu belirlenmiştir ve belirlenen fonksiyonel aktivitenin yarısından fazlasının β-kazein türevli peptidlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. ACE inhibitörü özellik gösteren peptidlerin sayısı en yüksek bulunurken, bunu antimikrobiyal ve antioksidan peptidler takip etmiştir. Yani, meydana gelen peptidlere bağlı olarak Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin tansiyon düşürücü bir gıda olduğu görülmektedir. Genellikle peynirde ACE inhibitörü peptidlerin yüksek sayıda olduğu birçok araştırmacı tarafından da belirtilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017). Gagnaire ve ark. (2011) tarafından Ragusano peynirinde ACE inhibitörü, immünomodülatör ve mineral taşıyıcı peptidler, Pisanu ve ark. (2015) tarafından çiğ koyun sütünden üretilen peynirlerde ACE inhibitörü, immünomodülatör, antioksidan, antibakteriyal, antikarsinojenik ve opioid peptidler ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde ACE inhibitörü, immünomodülatör ve antimikrobiyal peptidler tespit edilmiştir. Biyoaktivitelerin çeşitliliği arasında gözlemlenen bu farklılıkların gerçekleşen proteoliz ile peynirde oluşan peptidlere ve dolayısıyla üretim koşullarına, kullanılan koagülanta, üretimde kullanılan sütün çeşidi ve kompozisyonuna, peynir ortamındaki mikrobiyotaya ve bunların enzimlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu peynirlerle kıyaslandığında Karaman yöresine ait tulum peynirleri eşsiz bir biyoaktif peptid kaynağı sunmaktadır.

4.3.3.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.22.'de sunulmaktadır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 59 çeşit α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde Anamur yöresine kıyasla daha fazla ve Mut yöresine kıyasla daha az α_{s1}-KN türevli peptid belirlenmiştir. α_{s1}-KN türevli peptid sayısındaki farklıkların kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonundaki, koagülant çeşidi ve miktarındaki ve üretim metodundaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.22. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	2.554	1196.6938	α_{s1}-KN (16-25)	Bovine	RPKHPIKHQG	ACE inhibitörü	Saito ve ark. (2000)					*
2	2.557	929.4845	α_{s1}-KN (18-25)	Caprine	KHPINHQG	-	-				*	*
3	2.707	1139.6692	α_{s1}-KN (16-24)	Bovine	RPKHPIKHQ	ACE inhibitörü	Saito ve ark. (2000)	*	*	*	*	
4	4.002	1369.7495	α_{s1}-KN (18-29)	Ovine	KHPIKHQGLSPE	-	-			*		
5	4.081	584.3519	α_{s1}-KN (125-129)	Ovine	EIVPK	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
6	4.306	570.3022	α_{s1}-KN (85-89)	Bovine	EIVPN	Metal şelatlama	Timón ve ark. (2019)			*		
7	8.801	1622.9026	α_{s1}-KN (16-29)	Ovine	RPKHPIKHQGLSPE	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
8	13.540	1014.5419	α_{s1}-KN (48-55)	Caprine	RKENINEL	-	-		*			
9	15.369	643.3639	α_{s1}-KN (33-37)	Bovine	ENLLR	-	-	*	*			
10	15.673	757.4073	α_{s1}-KN (32-37)	Bovine	NENLLR	-	-		*			
11	16.499	601.3074	α_{s1}-KN (31-35)	Bovine	LNENL	-	-		*	*	*	*
12	16.664	754.3851	α_{s1}-KN (26-32)	Caprine	LSPEVPN	-	-		*			
13	16.728	811.4082	α_{s1}-KN (25-32)	Caprine	GLSPEVPN	-	-		*	*	*	*
14	18.020	559.2625	α_{s1}-KN (41-45)	Bovine	APFPE	DPP-4 inhibitörü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, ACE inhibitörü	Boots (2012) Boots (2013) Abdel-Hamid ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
15	18.099	988.5702	α_{s1}-KN (116-123)	Caprine	KKYNVPQL	ACE inhibitörü	Ruiz ve ark. (2004)	*	*	*	*	
16	18.480	601.3050	α_{s1}-KN (51-55)	Caprine	NINEL	-	-				*	*
17	18.492	1034.5041	α_{s1}-KN (100-108)	Bovine	DVPSERYLG	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)		*			
18	18.709	700.3743	α_{s1}-KN (30-35)	Bovine	VLNENL	ACE inhibitörü	Benavente ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
19	18.937	870.4925	α_{s1}-KN (31-37)	Bovine	LNENLLR	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017b)	*	*	*	*	*
20	19.316	730.3500	α_{s1}-KN (50-55)	Caprine	ENINEL	-	-		*	*		
21	19.776	977.4813	α_{s1}-KN (100-107)	Bovine	DVPSERYL	-	-			*	*	*
22	20.003	1106.5237	α_{s1}-KN (99-107)	Bovine	EDVPSERYL	-	-		*	*	*	
23	20.008	1370.8407	α_{s1}-KN (113-123)	Caprine	LRLKKYNVPQL	-	-	*				
24	20.080	569.3157	α_{s1}-KN (119-123)	Caprine	NVPQL	-	-	*	*	*	*	*
25	20.313	721.3631	α_{s1}-KN (107-112)	Bovine	LGYLEQ	-	-	*				

26	20.461	969.5614	α_{s1}-KN (30-37)	Bovine	VLNENLLR	Antibakteriyal	Hayes ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
27	21.147	658.3328	α_{s1}-KN (40-45)	Bovine	VAPFPE	-	-	*	*	*	*	*
28	21.222	601.3069	α_{s1}-KN (32-36)	Bovine	NENLL	Antioksidan	Bezerra ve ark. (2013)			*	*	*
29	21.525	531.3072	α_{s1}-KN (38-42)	Caprine	FVVAP	-	-		*	*	*	*
30	22.061	664.3413	α_{s1}-KN (109-113)	Bovine	YLEQL	-	-	*	*	*	*	*
31	22.671	529.2879	α_{s1}-KN (40-44)	Bovine	VAPFP	-	-	*	*	*	*	*
32	22.899	757.4084	α_{s1}-KN (39-45)	Caprine	VVAPFPE	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)	*	*	*	*	*
33	23.813	714.3907	α_{s1}-KN (31-36)	Bovine	LNENLL	-	-	*	*	*	*	*
34	23.963	732.3813	α_{s1}-KN (118-123)	Caprine	YNVPQL	-	-	*	*	*	*	*
35	23.965	531.3034	α_{s1}-KN (39-43)	Caprine	VVAPF	-	-		*	*	*	*
36	24.192	713.3965	α_{s1}-KN (25-31)	Ovine	GLSPEVL	-	-		*	*	*	*
37	24.271	721.3626	α_{s1}-KN (108-113)	Bovine	GYLEQL	-	-	*	*	*	*	*
38	24.347	658.3308	α_{s1}-KN (41-46)	Bovine	APFPEV	-	-	*	*			
39	24.497	1287.7276	α_{s1}-KN (39-49)	Caprine	VVAPFPEVFRK	-	-	*	*	*		
40	24.652	628.3566	α_{s1}-KN (39-44)	Caprine	VVAPFP	-	-	*	*	*	*	*
41	25.106	904.4794	α_{s1}-KN (32-38)	Bovine	NENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
42	25.109	813.4614	α_{s1}-KN (30-36)	Bovine	VLNENLL	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
43	25.337	790.4340	α_{s1}-KN (33-38)	Bovine	ENLLRF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
44	25.794	1060.5695	α_{s1}-KN (37-45)	Caprine	RFVVAPFPE	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	
45	26.175	757.3989	α_{s1}-KN (40-46)	Bovine	VAPFPEV	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
46	26.402	805.4017	α_{s1}-KN (39-45)	Bovine	FVAPFPE	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
47	26.941	1017.5587	α_{s1}-KN (31-38)	Bovine	LNENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*				
48	27.315	834.4484	α_{s1}-KN (107-113)	Bovine	LGYLEQL	-	-		*	*	*	*
49	27.547	856.4646	α_{s1}-KN (39-46)	Caprine	VVAPFPEV	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
50	27.775	1116.6302	α_{s1}-KN (30-38)	Bovine	VLNENLLRF	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
51	27.849	579.3052	α_{s1}-KN (39-43)	Bovine	FVAPF	-	-			*		
52	27.925	1159.6384	α_{s1}-KN (39-48)	Caprine	VVAPFPEVFR	-	-	*	*	*	*	*
53	28.230	676.3577	α_{s1}-KN (39-44)	Bovine	FVAPFP	Cilt yenileyici	Gorouhi ve Maibach (2009)	*	*	*	*	*
54	28.306	904.4663	α_{s1}-KN (38-45)	Caprine	FVVAPFPE	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
55	29.753	678.3716	α_{s1}-KN (38-43)	Caprine	FVVAPF	-	-					*

56	30.058	775.4277	α_{s1}-KN (38-44)	Caprine	FVVAPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
57	30.446	1680.8338	α_{s1}-KN (100-113)	Bovine	DVPSERYLGYLEQL	-	-	*				
58	31.508	904.4699	α_{s1}-KN (40-47)	Bovine	VAPFPEVF	ACE inhibitörü	del Mar Contreras ve ark. (2013)				*	*
59	32.574	1003.5378	α_{s1}-KN (39-47)	Bovine	VVAPFPEVF	ACE inhibitörü	Espejo-Carpio ve ark. (2013)	*	*	*	*	
Toplam								**37**	**45**	**44**	**42**	**39**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_851372, NP_001272624, NP_001009795). KN: kazein.
[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı: glukagon benzeri peptid-1 sekresyonunu artırarak insülin salımını artırmakta ve iştahı azaltmaktadır, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır.
[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Fox ve McSweeney (1997) α_{s1}-KN'in ilk olarak peynirde kalan koagülantın aktivitesi ile parçalandığını bildirmişlerdir. Peynir üretimi sırasında, pıhtı pişirme işlemi uygulanması sonucu koagülantın yani kimozinin aktivitesinin azaldığı ve böyle durumlarda sütte bulunan doğal katepsin D enziminin α_{s1}-KN'nin parçalanmasına düşük oranda katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017). Ayrıca, α_{s1}-KN olgunlaşma sırasında peynirde kalan kimozin ile ileri derecede hidrolize olmaktadır ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde mikrobiyal proteinazlar veya peptidazlar ve daha az olarak plazmin enzimi ile hidrolize olabilmektedir (Ardö ve ark., 2017). Kazeinlerin parçalanmasında rol alan mikrobiyal proteolitik enzimler proteinazlardan ve peptidazlardan oluşmaktadır. Genellikle, peynirde bulunan kazeinler mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalanırken, oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olduğu bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017). Requena ve ark. (1993) geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis, L. plantarum* ve *L. casei* suşlarına ait hücre içi enzimlerinin aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu ve en yüksek aminopeptidaz aktivitesini *L. casei* suşunun gösterdiğini bildirmişlerdir. Gene aynı araştırmacılar, en yüksek proteinaz aktivitesini *Lc. lactis* suşunda ve en yüksek dipeptidaz aktivitesini *L. plantarum* suşunda tespit etmişlerdir. *Lactococcus* hücrelerin hücre duvarında bulunan laktosepinin P_{III}-tipi proteinazlarının β-KN'e kıyasla α_{s1}-KN üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Law ve Haandrikman, 1997). Sadat-Mekmene ve ark. (2011) *L. helveticus* suşlarına ait proteinazların α_{s1}-KN üzerinde çok sayıda parçalama bölgelerinin bulunduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, Jensen ve ark. (2009) *L. helveticus* ait proteolitik enzimlerin α_{s1}-KN üzerindeki aktivitesinin suşlara bağlı olarak değiştiğini ve farklı *L. helveticus* suşlarının α_{s1}-KN üzerinde farklı bağları parçaladığı bildirmişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, genel olarak peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (46 adet) α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği gözlemlenmiştir. Diğer peptidlerin ise α_{s1}-KN'in orta kısmından (13 adet) meydana geldiği tespit edilmiştir. Genellikle, peynir üzerinde gerçekleştirilen çoğu çalışmada da peptidlerin genellikle α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir (Singh ve ark., 1997; Fernández ve ark., 1998; Sagardia ve ark., 2013; Fontenele ve ark., 2017). α_{s1}-KN üzerinde 3 farklı hidrofobik bölgenin bulunduğu ve bu bölgelerin 1-44, 90-113 ve 132-199 fraksiyonlarından oluştuğu bildirilmiştir (Swaisgood, 2003). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'in hidrofobik bölgelerinden daha fazla parçalandığı görülmüştür. Hidrofobik bölgeler olan α_{s1}-KN (16-44) bölgesinden 29

peptid ve α_{s1}-KN (99-113) bölgesinden 8 peptid olmak üzere toplam 37 peptid tanımlanmıştır. Bununla birlikte hidrofilik bölgeler olan α_{s1}-KN (48-89) bölgesinden 4 peptid ve α_{s1}-KN (113-129) bölgesinden 5 peptid olmak üzere toplam 9 peptid tanımlanmıştır. Ayrıca, 13 peptidin hidrofobik ve hidrofilik bölgeler arasından meydana geldiği belirlenmiştir. Bu durum hidrofobik bölgenin proteolitik enzimlere karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Miclo ve ark. (2012) tarafından α_{s1}-KN'in 1-40 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin ve Chang ve ark. (2013) tarafından α_{s1}-KN'in 8-35 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Sommerer ve ark. (2001) tarafından 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 17 peptid, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 50 peptid, Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 34 peptid ve Pisanu ve ark. (2015) tarafından 9 ay olgunlaştırılan çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerde 62 adet α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda olgunlaşma süresinin peptid sayısı üzerindeki etkisi net bir şekilde görülmektedir. Diğer taraftan, bu çalışmalara kıyasla 6 ay olgunlaştırılan Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla α_{s1}-KN türevli peptidin oluştuğu ilgi çekmektedir. Bu farklılığın üretimde kullanılan süt türü ve ısıl işlem gibi üretim metodundaki farklılıklardan ve peynirlerin mikrobiyotasındaki farklılıklardan meydana geldiği öngörülmektedir. Pastörize süt kullanılarak üretilen peynirlerde çiğ sütten üretilenlere kıyasla peptid sayısının azaldığı bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2004; Pisanu ve ark., 2015). Ayrıca, Losito ve ark. (2006) çeşitli İtalyan peynirlerinin üretiminde farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda suda çözünebilir ekstraktlarda farklı peptidlerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidlerin 5-14 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de 5-14 amino asit uzunluğuna sahip peptidler belirlenmiştir. Bu yörelere kıyasla, daha uzun bir peptid olan ve 21 amino asitten oluşan RPKHPINHQGLSPEVPNENLL peptidi Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu peptid israsidin peptidinin C terminal bölgesinden iki amino asit ayrılması ile meydana gelmiştir. Ancak, Anamur ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde bu peptidin ileri parçalanma ürünlerine rastlanmıştır. Bu farklılıklar proteolitik aktivitenin çeşitliliğini yansıtmaktadır. Sagardia ve ark. (2013) 4 ay

olgunlaştırılan Idizabal peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli peptidlerin 6-17 amino asit uzunluğuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, Gagnaire ve ark. (2011) 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 8-23 amino asit uzunluğuna sahip α_{s1}-KN türevli peptidler belirlemişlerdir. Sommerer ve ark. (2001) ise 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 3-8 amino asit dizilimine sahip daha kısa peptidler elde etmişlerdir. Amino asit uzunluğundaki bu farklılığın, suda çözünebilir ekstraktların 1000 Da'luk membran kullanılarak ultrafiltre edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptidler arasında pentapeptidlerin ve hekzapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunları heptapeptidlerin ve oktapeptidlerin takip ettiği görülmüştür. Karaman ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde Anamur yöresine kıyasla pentapeptidlerin baskın olduğu yani daha kısa peptidlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durum, Karaman ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyotaya bağlı olarak proteolitik enzim aktivitesinin daha yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Biyoaktif peptidlerin de 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden meydana geldiği göz önünde bulundurulduğunda, tanımlanan bu peptidlerin biyoaktif özellik gösterme potansiyeli çok yüksektir (Hartmann ve Meisel, 2007).

Peynirlerde, genellikle α_{s1}-KN'in proteolizi sonucunda israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana geldiği birçok çalışmada bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009; Pisanu ve ark., 2015; Georgalaki ve ark., 2017). İsrasidin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinde bulunan ve 23 amino asit uzunluğuna sahip antimikrobiyal özellik gösteren bir peptiddir (Pisanu ve ark., 2015). İsrasidin peptidinin dizilimi bazı amino asitlerdeki farklılıklardan dolayı süt çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Sforza ve ark., 2011). Bu peptid, inek sütünde RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden, koyun sütünde RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF amino asit dizilimlerinden ve keçi sütünde RPKHPINHQGLSPEVPNENLLRF amino asit dizilimlerinden meydana gelmektedir. İsrasidin, α_{s1}-KN'in koagülant kaynaklı kimozin ile parçalanması sonucu oluşmaktadır (Lahov ve Regelson, 1996). Buna ek olarak, ilerleyen olgunlaşma günlerinde israsidin ileri derecede hidrolize uğramaktadır. Gouda peynirlerinde israsidinin hidrolizi sonucu RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Saito ve ark., 2000). Idiazabal peynirinin 4 ay olgunlaştırılması ile israsidin peptidinin parçalanma ürünlerinin meydana geldiği tespit edilmiştir (Sagardia ve ark., 2013). Bunlarla birlikte, Coalho peynirinde israsidinin C terminal bölgesinin

hidrolize olmasıyla EVLNENLLR, NENLLRF, EVLNENLLRF ve VLNENLLRF peptidleri belirlenmiştir (Fontenele ve ark., 2017).

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde toplam 21 peptidin israsidin türevli olduğu gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen israsidin türevli peptid sayısı Anamur yöresine ait tulum peynirlerindekinden (18 peptid) yüksek bulunurken, Mut yöresine ait tulum peynirlerindekinden (28 adet) düşük bulunmuştur. Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılığın tulum peyniri üretiminde kullanılan koagülant çeşidinin ve miktarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'lerden 5 tanesinin, α_{s1}-KN (16-24), α_{s1}-KN (16-25), α_{s1}-KN (16-29), α_{s1}-KN (18-25) ve α_{s1}-KN (18-29), israsidinin N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. İsrasidinin orta bölgesinden 3 peptid, α_{s1}-KN (25-31), α_{s1}-KN (25-32) ve α_{s1}-KN (26-32), tanımlanmıştır. İsrasidinin C terminalinden bölgesinden ise 13 peptid, α_{s1}-KN (30-35), α_{s1}-KN (30-36), α_{s1}-KN (30-37), α_{s1}-KN (30-38), α_{s1}-KN (31-35), α_{s1}-KN (31-36), α_{s1}-KN (31-37), α_{s1}-KN (31-38), α_{s1}-KN (32-36), α_{s1}-KN (32-37), α_{s1}-KN (32-38), α_{s1}-KN (33-37) ve α_{s1}-KN (33-38), tanımlanmıştır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde israsidin türevli peptidler incelendiğinde, genel olarak karboksipeptidaz aktivitesine bağlı olarak C terminal bölgesinden parçalanmalar görülmektedir. Dolayısıyla, diğer proteolitik enzimlere kıyasla karboksipeptidazların israsidin üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile koyun sütünde israsidinin C terminal bölgesinden NENLLR peptidinin meydana geldiğini belirlemiş olup, *Lc. lactis*'e ait proteazların özellikle C terminalindeki fenilalanin (F) ve lösin bağlarını (L) etkilediğini bildirmişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, α_{s1}-KN'de israsidin peptidini takip eden bölgeden 24 adet peptidin, α_{s1}-KN (37-45), α_{s1}-KN (38-42), α_{s1}-KN (38-43), α_{s1}-KN (38-44), α_{s1}-KN (38-45), α_{s1}-KN (39-43/caprine), α_{s1}-KN (39-43/bovine), α_{s1}-KN (39-44/caprine), α_{s1}-KN (39-44/bovine), α_{s1}-KN (39-45/caprine), α_{s1}-KN (39-45/bovine), α_{s1}-KN (39-46/caprine), α_{s1}-KN (39-47), α_{s1}-KN (39-48), α_{s1}-KN (39-49), α_{s1}-KN (40-44), α_{s1}-KN (40-45), α_{s1}-KN (40-46), α_{s1}-KN (40-47), α_{s1}-KN (41-45), α_{s1}-KN (41-46), α_{s1}-KN (48-55), α_{s1}-KN (50-55) ve α_{s1}-KN (51-55), meydana geldiği gözlemlenmiştir. Çizelge 4.22'de meydana gelen peptidlerin süt kaynağı daha detaylı olarak sağlanmıştır, burada peptidlerin farklılığını belirtmek amacıyla inek veya keçi sütüne ait olduğu belirtilmiştir. İsrasidin bölgesinde olduğu gibi bu bölgede de karboksipeptidazların daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca, α_{s1}-KN'nin orta bölgesinden de parçalanmalar

olduğu ve 13 adet peptidin, α_{s1}-KN (99-107), α_{s1}-KN (100-107), α_{s1}-KN (100-108), α_{s1}-KN (100-113), α_{s1}-KN (107-112), α_{s1}-KN (107-113), α_{s1}-KN (108-113), α_{s1}-KN (109-113), α_{s1}-KN (113-123), α_{s1}-KN (116-123), α_{s1}-KN (118-123), α_{s1}-KN (119-123) ve α_{s1}-KN (125-129), oluştuğu tespit edilmiştir. α_{s1}-KN'nin orta bölgesinde ise aminopeptidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu ve bunu sırasıyla karboksipeptidaz ve endopeptidaz aktivesinin takip ettiği görülmektedir. Son olarak, muhtemelen proteinaz aktivitesine bağlı olarak α_{s1}-KN'in orta bölgesinden hemen önce bir peptid, α_{s1}-KN (85-89), gözlemlenmiştir. Genel olarak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN üzerindeki diğer bölgelere kıyasla israsidin peptidini takip eden bölgeden daha fazla peptidin meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerindeki bulgular ile benzer şekilde Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde α_{s1}-KN türevli RPKHPIKHQ, NENLLRF ve VLNENLLRF peptidleri ve Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde VLNENL, LNENL, VVAPFP, VVAPFPE, VVAPFPEV, VAPFP, VAPFPE, APFPE, ENINEL ve EIVPK peptidleri belirlenmiştir. Bu çalışmada belirlenen α_{s1}-KN türevli VLNENL, VVAPFPEV, VVAPFPE, VAPFPE, NINEL ve EIVPK peptidleri 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde de tespit edilmiştir (Sommerer ve ark., 2001). Ayrıca, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan israsidin türevli RPKHPIKHQ, VLNENLLRF ve NENLLRF peptidleri Gagnaire ve ark. (2011) tarafından da 8 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde gözlemlenmiştir.

Demirci (2019) Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında *Lc. lactis* suşlarının baskın bulunduğunu ve bunu sırasıyla *E. hirae, E. faecium, S. thermophilus* ve *L. plantarum* suşlarının takip ettiğini bildirmiştir. İlgili araştırmacı ayrıca 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise *E. faecium* ve *E. hirae* suşlarının baskın olduğunu ve bunları *L. plantarum* ve *E. faecalis* suşlarının takip ettiğini tespit etmiştir. Dolayısıyla bu suşlara ait proteolitik enzimlerin Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenen peptidlerin oluşumunda büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteazların koyun ve inek sütünde israsidin peptidini takip eden sıradaki FVVAPFP, FVVAPFPE, VVAPFPE, VAPFPE ve VAPFPEVF peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Requena ve ark. (1993) geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğunu ve *Lc. lactis*'e ait hücre içi enzimlerin N terminalinde bulunan lizine karşı yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca, bu araştırmacılar ilgili suşlar

arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini *L. plantarum* suşlarında belirlemiştir. González ve ark. (2010) İspanyol peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 suşunun *Leuconostoc* (*Leu.*) *mesenteroides, Leu. pseumesenteroides, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, *Lc. lactis* GE 2363 suşunun N terminalinde bulunan lizin, prolin ve lösine karşı aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini, *L. plantarum* GE 2077 suşunun ise yalnızca lösine karşı *Lc. lactis* GE 2363 suşuna kıyasla daha az oranda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Georgalaki ve ark. (2017) *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* ile 24 saat fermente edilen inek sütünde yüksek oranda israsidinin N terminal bölgesinden gelen peptidlerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *S. thermophilus*'a ait proteolitik enzimlerin israsidinin C terminal bölgesinden VLNENLLRF peptidinin meydana gelmesine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Veljovic ve ark. (2009) fermente edilmiş gıdalardan izole edilen *E. faecalis* suşlarının α_{s1}-KN'in yüksek oranda hidrolizine neden olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Suzzi ve ark. (2000) geleneksel İtalyan keçi peynirlerinden izole edilen enterokok suşları arasında en yüksek proteolitik aktivitenin *E. faecalis* suşlarında olduğunu ve bunu sırasıyla *E. faecium* ve *E. hirae*'nin takip ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, geleneksel İspanyol peynirlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği ve buna kıyasla daha düşük oranda aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (González ve ark., 2010). Bu araştırmacılar *E. faecalis*'e ait proteolitik enzimlerin dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini de tespit etmişlerdir. Serio ve ark. (2010) ise Pecorino Abruzzese peynirinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarına ait hem hücre içi hem hücre dışı proteolitik enzimlerin *E. faecium* suşlarına kıyasla daha yüksek lizil aminopeptidaz, arjinin aminopeptidaz ve X-prolil dipeptidil aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN üzerinde gözlemlenen karboksipeptidaz aktivitesinin özellikle, *Lc. lactis*, *E. faecalis* ve *S. thermophilus* suşlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, aminopeptidaz aktivitesinde ise özellikle *E. faecalis, E durans, Lc. lactis*, *L. plantarum* ve *S. thermophilus* suşlarına ait proteolitik enzimlerin önemli bir rol aldığı öngörülmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen α_{s1}-KN türevli peptid sayısında olgunlaşma süresi boyunca dalgalanma göstermekle beraber olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda kısmen artmıştır. Bu durum, bazı

peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması, bazı peptidlerin peynirde birikmesi ve bazılarının ise hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir. Çünkü toplam belirlenen α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşmanın son gününde belirlenen peptid sayısından fazladır. Bu da peptid çeşitliliğini yansıtmaktadır. Gagnaire ve ark. (2011) de olgunlaşma süresinin ilerlemesiyle birlikte Ragusano peynirinde bazı peptidlerin ileri düzeyde parçalandığını ve yeni peptidlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla 8. ayında daha fazla α_{s1}-KN türevli peptid belirlemişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 59 farklı çeşitte α_{s1}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 26 peptidin, EIVPK, RPKHPIKHQGLSPE, VLNENLLRF, VLNENLLR, VLNENLL, VLNENL, NENLLRF, ENLLRF, LNENLLR, LNENLL, VVAPFPEVFR, VVAPFPEV, VVAPFPE, VAPFPEV, VVAPFP, FVVAPFPE, FVVAPFP, FVAPFPE, FVAPFP, VAPFPE, VAPFP, APFPE, YNVPQL, NVPQL, GYLEQL ve YLEQL, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin farklı aşamalarında korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de belirlenmiş olup, olgunlaşma süresince bu peptidlerin devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu korunmuş peptidlerden EIVPK dışındaki peptidlerin hepsinin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği görülmektedir. Bu korunmuş peptidlerin %36'sının israsidinin parçalanma ürünlerinden, %64'ünün ise α_{s1}-KN'de israsidini takip eden bölgenin parçalanmasıyla meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde NENL, NVPQL, APFP ve YLEQL'yi içeren korunmuş sekansların da bulunduğu fark edilmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) da Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca RPKHPIKHQ, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, NENLLRF ve FVAPFPEVFGKEKV peptidlerinin bulunduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacı da genellikle israsidin kökenli ve israsidin peptidini takip eden bölgelerden peptidlerin kaldığını tespit etmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptidlerden 14 tanesi, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ancak, bu yörelerden farklı olarak Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde EIVPK, APFPE, VAPFP, LNENLLR, LNENLL, YNVPQL, NVPQL ve YLEQL peptidlerinin olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu belirlenmiştir. Peptidlerde gözlemlenen bu değişimlerin peynir üretim

metoduna, kullanılan süte ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olarak proteolitik sisteminin çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidler ve peptid dinamiği bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü, metal şelatlayıcı ve cilt yenileyici olmak üzere 7 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. α_{s1}-KN türevli 18 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği ve dolayısıyla biyoaktif peptidler arasında ACE inhibitörü peptid sayısının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği görülmektedir. Karaman yöresinde belirlenen α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptidler; RPKHPIKHQGLSPE, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQ, EIVPK, KKYNVPQL, DVPSERYLG, VLNENLLRF, VLNENLL, VLNENL, ENLLRF, FVVAPFPE, FVVAPFP, FVAPFPE, VVAPFPEVF, VAPFPEVF, VVAPFPE, VAPFPEV ve APFPE peptidlerinden oluşmaktadır. Bounouala ve ark. (2017) koyun ve inek sütlerinde *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait proteazların etkisiyle oluşan FVVAPFPE, FVVAPFP, VVAPFPE ve KYNVPQL peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Gouda peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra yüksek antihipertansif etki gösteren RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidleri tespit edilmiştir (Saito ve ark., 2000). Ruiz ve ark. (2004) Manchego peynirinden izole edilen KKYNVPQL peptidinin 77.1 µM IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. ACE inhibitörü biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen ACE inhibitörü peptidlerin çoğunda da fenilalanin (F), lösin (L), valin (V), glisin (G) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmektedir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik prolin amino asidi bulunan peptidlerin daha yüksek ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini ve fenilalanin bulunanların ise daha düşük oranda ACE inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir.

APFPE peptidinin ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü ve GLP-1 sekresyonunu artırıcı özelliklere sahip çok fonksiyonlu bir peptid olduğu belirlenmiştir (Boots, 2012; 2013; Abdel-Hamid ve ark., 2017). Bu multifonksiyonel peptid, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tüm olgunlaşma süresi boyunca tespit edilmiştir. GLP-1'in insülin sekresyonunu artırdığı, iştahı azalttığı, gastrik boşalmayı geciktirdiği ve kilo verdirdiği

bildirilmiştir (Güler ve Demir Önal, 2015). GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve dolasıyla insülin salımının artmasına bağlı olarak iştahı azaltan diğer peptidlerden LNENLLRF olgunlaşma süresinin başında ve NENLLRF ise tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, insülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik gösteren bir diğer peptid LNENLLR ise tüm olgunlaşma süresi boyunca belirlenmiştir. Metal şelatlama özelliğine sahip EIVPN peptidi olgunlaşma süresinin 60. gününde gözlemlenmiştir. Cilt yenileyici özellik gösteren FVAPFP peptidi ise tüm olgunlaşma süresi boyunca görülmüştür. FVAPFP peptidinin kollajen sentezini artırdığı bildirilmiştir (Gorouhi ve Maibach, 2009).

Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde belirlenen antibakteriyal peptidler Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Antibakteriyal özelliklere sahip VLNENLLR ve VVAPFPEV peptidleri tıpkı Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi 180 gün boyunca tüm olgunlaşma günlerinde belirlenirken, antibakteriyal RFVVAPFPE peptidi ise olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar gözlemlenmiştir. RFVVAPFPE ve VVAPFPEV peptidlerinin *Lactobacillus sakei, Lactobacillus helveticus, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Escherichia coli, Bacillus megaterium, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Salmonella* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı antibakteriyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Rizzello ve ark., 2005). VLNENLLR peptidinin ise *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 ve *Escherichia coli* DPC5063'e karşı yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Hayes ve ark., 2006).

VLNENLL ve FVAPFPE peptidlerinin hem antioksidan hem ACE inhibitörü özellik göstererek çok fonksiyonlu peptidler olduğu görülmüştür (Hernández-Ledesma ve ark., 2005). Bu peptidler, tüm olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, antioksidan özellik gösteren NENLL peptidine ise olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde rastlanılmıştır. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin (Y) amino asitlerini içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durum, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen antioksidan peptidlerle uyumluluk göstermektedir. VLNENLL peptidinin N terminal bölgesinde hidrofobik valin amino asidi bulunmaktadır. Bununla birlikte, FVAPFPE peptidi fenilalanin ve prolin amino asitlerini ve NENLL peptidi ise lösin amino asidini içermektedir.

4.3.3.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.23.'te sunulmaktadır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 11 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla en fazla α_{s2}-KN türevli peptid çeşidi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Farklı yörelere ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında görülen farklılığın; tulum peyniri üretiminde kullanılan süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi, koagülant miktarı, aktif peynir mikrobiyotası ve üretim metodu ile ilgili farklılıklara bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin, 6 tanesinin orta bölgeden ve 5 tanesinin C terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, α_{s2}-KN'in N terminal bölgesinin parçalanması sonucu peptidlerin meydana gelmediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgesinden oluştuğu görülmektedir. Genel olarak, peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptidlerin α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinin parçalanmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2011; Sagardia ve ark., 2013; Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017).

α_{s2}-KN'in, α_{s1}-KN'e kıyasla kimozin enzimine karşı daha dirençli olduğu ve bununla birlikte plazmin enzimine karşı oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994; Fox ve McSweeney, 1996). Sütün doğal enzimi olan plazmin enziminin, α_{s2}-KN üzerinde özellikle lizin amino asidi (K) bulunan bağlarda aktivite gösterdiği ve daha az oranda ise arjinin amino asidi (R) bulunan bağlara etki ettiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin enziminin aktivitesi ile α_{s2}-KN'in çoğunlukla C terminal ve orta bölgelerinden peptidlerin meydana geldiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, Larsen ve ark. (1996) sütte doğal olarak bulunan diğer bir enzim olan katepsin D'nin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgelerinde bulunan lösin (L) ve tirozin (Y) bağlarında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgesinden tanımlanan peptidler bu enzimlerin aktivitesini desteklemektedir. Ayrıca, peynirlerin olgunlaşma süresince mikrobiyal proteolitik enzimler, α_{s2}-KN'in ileri derecede

hidrolizinde rol alabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Solieri ve ark., 2018; Rubak ve ark., 2020).

Gagnaire ve ark. (2001) tarafından koagülant olarak *Endothia parasitica*'dan (*Cryphonectria parasitica*) elde edilen fungal kaynaklı enzim, starter kültür olarak termofilik laktik asit bakterileri (streptokok ve laktobasil) ve ikincil starter olarak propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 9 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Gómez-Ruiz ve ark. (2004) tarafından koagülant olarak rennet ve starter kültür olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) suşları kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra 12 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) tarafından pıhtısı haşlanan bir peynir çeşidi olan Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması süresince toplam 17 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid belirlenmiştir. Sagardia ve ark. (2013) tarafından çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 11 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Fontenele ve ark. (2017) tarafından koagülant olarak kimozin kullanılan ve çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde toplam 5 adet α_{s2}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Manchego ve Ragusano peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptid sayısından daha yüksek bulunurken, Emmental, Coalho ve Idiazabal peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Karaman yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptidlerden YQGPIVLNPWDQVKR peptidi hem Ragusano hem Coalho peynirinde de gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, NAIPYVR peptidine ise Idiazabal peynirlerinde de rastlanmıştır. Ancak, genel itibari ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidler çeşit bakımından bu peynirlerden oldukça farklılık göstermektedir. Gerçekleştirilen çalışmalara dayanarak, peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında ve çeşidinde gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, koagülant miktarına, koagülant çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidler, bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Çizelge 4.23. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	4.382	755.3975	α_{s2}-KN (207-212)	Caprine	KPWTQP	-	-					*
2	18.176	689.3381	α_{s2}-KN (132-138)	Caprine	AGPFTPT	-	-		*	*	*	*
3	18.484	831.4574	α_{s2}-KN (215-221)	Caprine	NAIPYVR	-	-	*				
4	18.941	972.4714	α_{s2}-KN (104-110)	Bovine	YQKFPQY	Antioksidan, ACE inhibitörü	Silva ve ark. (2006); del Mar Contreras ve ark. (2013)	*				
5	21.832	1799.0249	α_{s2}-KN (204-218)	Bovine	KAMKPWIQPKTKVIP	Antibakteriyal	Alvarez-Ordóñez ve ark. (2013)		*			
6	23.885	1744.8836	α_{s2}-KN (205-219)	Caprine	AMKPWTQPKTNAIPY	-	-	*				
7	24.499	1648.9044	α_{s2}-KN (116-129)	Bovine	QGPIVLNPWDQVKR	-	-		*	*	*	*
8	25.487	1811.9625	α_{s2}-KN (115-129)	Bovine	YQGPIVLNPWDQVKR	ACE inhibitörü	Meira ve ark. (2012)	*	*	*	*	
9	25.565	1813.9680	α_{s2}-KN (175-188)	Caprine	NRLNFLKKISQYYQ	-	-		*			
10	26.785	1492.8081	α_{s2}-KN (116-128)	Bovine	QGPIVLNPWDQVK	-	-					*
11	30.134	894.4950	α_{s2}-KN (117-124)	Bovine	GPIVLNPW	-	-					*
Toplam								**4**	**5**	**3**	**3**	**5**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_776953, NP_001272514, NP_001009363). KN: kazein.
[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü.
[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin 6-15 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler arasında heptapeptidlerin ve pentadekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu görülmüştür. Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde daha uzun amino asit dizilimlerinden oluşan α_{s2}-KN türevli peptidler tanımlanmıştır. Bu durum proteolitik enzim çeşitliliğinin ve dolayısıyla enzim aktivitesinin Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde farklı olduğunu göstermektedir. Gagnaire ve ark. (2001) tarafından 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 4-32, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 4-10, Sagardia ve ark. (2013) tarafından 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde 5-16 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidler tanımlanmıştır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid uzunluğu Idiazabal ve Coalho peynirlerinde gözlemlenen α_{s2}-KN türevli peptidlere daha yakın bulunmasına rağmen, genel olarak bu peynirlerde farklı α_{s2}-KN türevli peptidler belirlenmiştir. Farklı peynirlerin α_{s2}-KN türevli peptid uzunluğunda ve çeşitliliğinde gözlemlenen değişimler, daha önce de belirtildiği gibi proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Fonksiyonel özellik gösteren biyoaktif peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden oluştuğu bildirilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen kısa zincirli α_{s2}-KN türevli peptidlerden 3 tanesinin biyoaktif peptid olduğu saptanmıştır. Bu peptidlerin antibakteriyal, ACE inhibitörü ve antioksidan olmak üzere 3 farklı biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. YQKFPQY, α_{s2}-KN (104-110), peptidinin hem tansiyon düşürücü hem de antioksidan özelliklerine sahip multifonksiyonel bir peptid olduğu belirlenmiştir. Silva ve ark. (2006) sterilize koyun ve keçi sütünün *Cynara cardunculus* proteazı ile koagüle edilmesi sonucu meydana gelen YQKFPQY peptidinin 95.46 µg/mL'lik IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini ve 0.068 mM TEAC değeri ile antioksidan özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, del Mar Contreras ve ark. (2009) YQKFPQY peptidinin 20.08 µM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiğini ve 2.033 µmol eşdeğeri Trolox μmol^{-1} ile antioksidan özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan KAMKPWIQPKTKVIP peptidinin *Cronobacter sakazakii* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı sırasıyla >1250 ve 156.25 µM MIC değeri ile antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Alvarez-Ordóñez ve ark.,

2013). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen YQGPIVLNPWDQVKR peptidi çiğ koyun sütünden üretilen ve 90 gün olgunlaştırılan Rokfor peynirinde de belirlenmiştir (Meira ve ark., 2012). İlgili araştırmacılar bu peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Swaisgood (1992) α_{s2}-KN üzerinde 90-120 ve 160-207 bölgelerinden oluşan iki hidrofobik alanın bulunduğunu bildirmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde iki peptidin, α_{s2}-KN (104-110) ve α_{s2}-KN (175-188), hidrofobik bölgeden ve üç peptidin α_{s2}-KN (132-138), α_{s2}-KN (207-212) ve α_{s2}-KN (215-221), hidrofilik bölgeden meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, 6 peptidin, α_{s2}-KN (115-129), α_{s2}-KN (116-128), α_{s2}-KN (116-129), α_{s2}-KN (117-124), α_{s2}-KN (204-218) ve α_{s2}-KN (205-219), hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri içeren peptidlerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN üzerinde çok çeşitli proteolitik enzim aktivitesi görülmüştür.

Hidrofobik bölgede belirlenen YQKFPQY peptidi, α_{s2}-KN (104-110), kalan koagülant yani kimozin aktivitesine, katepsin D aktivitesine veya mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. α_{s2}-KN üzerinde YQKFPQY peptidinden sonra lösin amino asidi bulunmaktadır ve bu peptidin başında ve sonunda tirozin amino asitleri bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu durum lösin amino ve tirozin amino asitlerine ait peptid bağlarında aktivite gösteren katepsin D'nin etkili olabileceğini düşündürmektedir (Larsen ve ark., 1996). Ayrıca, McSweeney ve ark. (1994) kimozin enziminin α_{s2}-KN üzerinde yalnızca hidrofobik bölgelerde aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Moreno-Montoro ve ark. (2018) *S. thermophilus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde YQKFPQY peptidinin oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazının koyun sütünde YQKFPQY peptidini meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, YQKFPQY peptidinin oluşumunda mikrobiyal enzimler de görev almış olabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrofobik bölgesinde belirlenen bir diğer peptid olan NRLNFLKKISQYYQ, α_{s2}-KN (175-188), muhtemelen plazmin enziminin veya mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesine ve ayrıca gene kimozin aktivitesine bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. NRLNFLKKISQYYQ peptidinin kazosidin peptidinin parçalanma ürünü olduğu görülmektedir. Kazosidin, antibakteriyal özelliklere sahip ve 39 amino asitten oluşan (KTKLTEEEKNRLNFLKKISQYYQKFAWPQYLKTVDQHQK) α_{s2}-KN türevli bir

peptiddir (Zucht ve ark., 1995). Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait peptidazların ve proteinazların kazosidin peptidini parçaladıklarını bildirmişlerdir. Dolayısıyla, kazosidinin parçalanma ürünü olan NRLNFLKKISQYYQ peptidinin oluşumunda mikrobiyal enzimlerin de görev almış olabilir. Ancak, bu peptidin özellikle plazmin enziminin aktivitesine bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Çünkü, α_{s2}-KN'de yer alan NRLNFLKKISQYYQ peptidinin başında ve sonunda lizin amino asitlerinin bulunması özellikle lizin bağları üzerinde aktivite gösteren plazmin enziminin etkili olabileceğini göstermektedir (Bastian ve ark., 1997).

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrofilik bölgelerinden ise KPWTQP, AGPFTPT ve NAIPYVR peptidleri tanımlanmıştır. Bu peptidlerin, mikrobiyal proteolitik enzimlerle meydana geldiği düşünülmektedir. Ancak, KPWTQP peptidinin başında lizin amino asidi bulunması ve ayrıca α_{s2}-KN'de bu peptidi takiben de lizin amino asidin bulunması bu peptidin oluşumunda olası plazmin aktivitesini de akla getirmektedir (Bastian ve ark., 1997). AGPFTPT peptidine Mut yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, NAIPYVR peptidi çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde de belirlenmiştir (Sagardia ve ark., 2013).

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelerini içeren AMKPWTQPKTNAIPY, KAMKPWIQPKTKVIP, YQGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVK ve GPIVLNPW peptidleri belirlenmiştir. Genel olarak bu peptidlerin, sütte bulunan doğal enzimlerin ve mevcut mikrobiyotaya ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile meydana geldiği düşünülmektedir. AMKPWTQPKTNAIPY, KAMKPWIQPKTKVIP, YQGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidlerinin başında veya sonunda plazmin ve katepsin D enzimlerinin aktivite gösterdiği lizin, arjinin veya tirozin amino asitlerine ait bağlar bulunmaktadır. Ayrıca bu peptidler mikrobiyal proteolitik enzimlerle de meydana gelmiş olabilir. Chang ve ark. (2014) *S. thermophilus* 4F44 suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların YQGPIVLNPWDQVKR peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Tonolo ve ark. (2020) *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile fermente edilen sütlerde QGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidlerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Fan ve ark. (2019) *L. helveticus*'a ait hücre dışı enzimlerin aktivitesi ile QGPIVLNPWDQVK peptidinin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerine ek olarak, YQGPIVLNPWDQVKR peptidi Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011), Rokfor (Meira ve ark., 2012) ve Coalho

(Fontenele ve ark., 2017) peynirlerinde de belirlenmiştir. Ayrıca, QGPIVLNPWDQVKR peptidi Pisanu ve ark. (2015) tarafından çiğ koyun sütünden üretilen ve 9 ay olgunlaştırılan peynirlerde de belirlenmişlerdir. GPIVLNPW peptidinin mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesi ile meydana geldiği düşünülmektedir. Çünkü bu peptidin başında veya sonunda plazmin veya katepsin D enziminin etkili olduğu amino asit bağları bulunmamaktadır. Bu peptidin, karboksipeptidaz ve endopeptidaz aktivitesi ile QGPIVLNPWDQVK peptidinden meydana geldiği öngörülmektedir. Bununla birlikte, QGPIVLNPWDQVKR peptidinin aminopeptidaz aktivitesi ile YQGPIVLNPWDQVKR peptidinden meydana geldiği ve QGPIVLNPWDQVK peptidinin ise karboksipeptidaz aktivitesi ile QGPIVLNPWDQVKR peptidinden meydana geldiği görülmüştür.

Demirci (2019) Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresinin başında *Lc. lactis* suşlarının baskın olduğunu, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde ise *E. faecium* suşlarının baskın olduğunu belirlemiştir ve bu olgunlaşma süresince peynirlerde *E. hirae, E. durans, E. faecalis, S. thermophilus, L. plantarum, L. brevis* ve *Lc. garvieae* suşlarının da bulunduğunu tespit etmiştir. İlgili araştırmacı, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden farklı olarak Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde *S. thermophilus* ve *Lc. garvieae* suşlarının bulunduğunu gözlemlemiştir. Dolayısıyla, bu farklı mikrobiyota Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptidlerin daha fazla miktarda meydana gelmesine neden olmuş olabilir.

Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların koyun sütünde α_{s2}-KN'in orta bölgesinden YQKFPQY, LYQGPIVLNPW ve YQGPIVLNPW peptidlerini meydana getirdiğini ve *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile inek sütünde ise α_{s2}-KN türevli peptidlerin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. α_{s2}-KN türevli YQKFPQY peptidi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu araştırmacılar *Lc. lactis*'e hücre dışı proteinazların koyun sütünde VSSSEEPINI, ALNEINQF, FPQYL, ISQYYQK, FAWPQY, TNAIPY peptidlerini ve inek sütünde ise yalnızca NPWDQ peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin suş ve süt türüne göre değiştiği görülmektedir. Diğer bir çalışmada ise *Lc. lactis*'e ait hücre duvarı ilişkili proteinazın (laktosepin) Cheddar peynirinde α_{s2}-KN (f 1-21) peptidinin oluşumundan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Broadbent ve ark., 2002).

Serra da Estrela peynirinden izole edilen *L. paracasei, Leu. mesenteroides, Lc. lactis* ve *E. faecium* suşlarının C terminalinde bulunan arjinin amino asidine karşı

karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir (Macedo ve ark., 2000). Ancak, bu suşlar arasında arjinin amino asidine karşı en yüksek karboksipeptidaz aktivitesini Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de baskın olarak bulunan *Lc. lactis* ve *E. faecium* suşları göstermiştir. Ayrıca, González ve ark. (2010) İspanyol peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 ve *E. faecalis* GE 2320 suşlarının *Leu. mesenteroides, Leu. pseumesenteroides, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte, *S. thermophilus* (PepN) suşlarının N terminal bölgesinde bulunan tirozin amino asidine karşı aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Chavagnat ve ark., 1999). Dolayısıyla, YQGPIVLNPWDQVKR peptidinden QGPIVLNPWDQVKR peptidinin oluşumunda N terminalinde tirozin amino asidinde gerçekleştiği düşünülen aminopeptidaz aktivitesi ve QGPIVLNPWDQVKR peptidinden QGPIVLNPWDQVK peptidinin oluşumunda C terminalinde arjinin amino asidi üzerinde gerçekleştiği öngörülen karboksipeptidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir.

Miclo ve ark. (2012) fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların çok sayıda α_{s2}-KN türevli peptidin meydana gelmesine neden olduğunu ve özellikle bu proteinazların sırasıyla β-, α_{s2}- ve α_{s1}-KN üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların *S. thermophilus*'a ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile belirledikleri α_{s2}-KN türevli YQGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidleri Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de tanımlanmıştır. Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* suşlarının aminopeptidaz, prolinaz, dipeptidaz, tripeptidaz ve endopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının ise aminopeptidaz, prolinaz ve endopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacılar, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait peptidazların ve proteinazların α_{s2}-KN türevli kazosidin peptidini parçaladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, Moreno-Montoro ve ark. (2018) *S. thermophilus, L. bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde α_{s2}-KN türevli IYKQEK, NMAIHPR, YQKFPQY, LQYPYQGPIVL, LKKISQ, LKKISQY, LKTVDQHQK, TVDQHQK, VDQHQK ve AMKPWTQPK peptidlerinin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Bu peptidlerden, LKKISQ, LKKISQY, LKTVDQHQK, TVDQHQK ve VDQHQK kazosidinin parçalanma ürünleridir ve ayrıca YQKFPQY peptidine Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır.

Veljovic ve ark. (2009) *E. faecium, E. faecalis* ve *E. avium* suşlarına ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile α_{s2}-KN türevli peptid belirlememişlerdir. Suzzi ve ark. (2000) *E. faecalis* suşunun *E. faecium, E. hirae, E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarına kıyasla 10 ve 37 °C'de proteolitik aktivitesinin daha yüksek olduğunu, 37 °C'de *E. faecium* suşunun düşük proteolitik aktiviteye sahip olduğunu ve 10 °C'de *E. hirae, E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının proteolitik aktivite göstermediğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, tulum peynirlerinin 4-6 °C'de olgunlaştırıldığı göz önünde bulundurulduğunda enterokok suşları arasından *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait proteolitik enzimlerin Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gerçekleşen proteolizde etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, Serio ve ark. (2010) Pecorino Abruzzese peynirinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarına ait hem hücre içi hem hücre dışı proteolitik enzimlerin 30 °C'de *E. faecium* suşlarına kıyasla daha yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli peptid sayısı dalgalı bir seyir göstermiş olup, genel olarak tüm olgunlaştırma günlerinde belirlenen peptid sayısı birbirlerine yakın bulunmuştur. Ancak, bu olgunlaşma süresince α_{s2}-KN türevli bazı peptidlerin ileri derece hidrolize olması sonucu yok olduğu ve bazı peptidlerin yeni oluştuğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında NAIPYVR, YQKFPQY, AMKPWTQPKTNAIPY ve YQGPIVLNPWDQVKR peptidlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu peptidlerden YQGPIVLNPWDQVKR peptidinin olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar bulunduğu tespit edilmiştir ve diğer peptidlerin ise olgunlaşma süresinin 7. gününden sonra bulunmadığı saptanmıştır. Olgunlaşma süresinin 30. gününde yeni oluşan AGPFTPT, KAMKPWIQPKTKVIP, QGPIVLNPWDQVKR ve NRLNFLKKISQYYQ peptidleri ile YQGPIVLNPWDQVKR peptidinin bulunduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin 30. gününü takiben KAMKPWIQPKTKVIP ve NRLNFLKKISQYYQ peptidlerinin ileri derecede hidroliz olduğu ve olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinde yalnızca AGPFTPT, YQGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVKR peptidlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra YQGPIVLNPWDQVKR peptidinin ileri derece hidroliz olduğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise AGPFTPT ve QGPIVLNPWDQVKR peptidlerine ek olarak KPWTQP, QGPIVLNPWDQVK ve GPIVLNPW peptidlerinin meydana geldiği belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca bazı peptidlerin ileri derecede hidroliz olmasının plazmin veya mikrobiyal enzim aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği

düşünülmektedir. Özellikle olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, farklı yörelere ait tulum peynirlerinin kullanılan süt çeşidine, üretim metoduna ve mevcut mikrobiyotaya bağlı olarak farklı proteolitik enzim çeşitliliğine sahip olmasından kaynaklanmış olabilir.

Geleneksel Manchego peynirlerinin olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla olgunlaşma süresinin 8. ayında α_{s2}-KN türevli peptid sayısının 1'den 8'e arttığı tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Diğer taraftan, Ragusano peynirlerinde olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 7. ayında α_{s2}-KN türevli peptid sayısının 17'den 2'ye düştüğü gözlemlenmiştir (Gagnaire ve ark., 2011). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise 6 ay olgunlaştırma süresi boyunca neredeyse benzer α_{s2}-KN türevli peptid sayısı gözlemlenmiştir. Peynir çeşitlerine bağlı olarak olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, yoğun düzeyde gerçekleşen enzimatik aktive sonucu bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması ve bazılarının ise farklı proteolitik enzimlerle hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir. Dolayısıyla, bu farklılıklar peynirlerdeki proteolitik sistemin özgünlüğünü yansıtmaktadır.

Diğer yörelerde olduğu gibi, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli peptid sayısı, α_{s1}- ve β-KN türevli peptidlerdeki gibi artış göstermemiştir. Bu durum, α_{s2}-KN'in α_{s1}- ve β-KN'e kıyasla Karaman yöresine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bhat ve ark. (2016) α_{s2}-KN'indeki disülfit bağlarının proteolitik enzimlere karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığını bildirmiştir. α_{s2}-KN'inin plazmin aktivitesine çok duyarlı olduğu (Fox ve McSweeney, 1996) ve Katepsin D enziminin de peynirde α_{s2}-KN'nin hidrolizinde rol aldığı bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2001). Katepsin D'nin optimum aktiviteyi pH 4.0'te gösterdiği (McSweeney ve ark., 1995) ve plazmin aktivitesinin pH 5.0-5.2 aralığında peynirde sınırlı olduğu (Larsson ve ark., 2006) dikkate alındığında, olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin pH değerinin 4.74-5.12 arasında olmasının plazmin ve katepsin D aktivitesini sınırlandırdığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, tulum peynirlerin su aktivitesinin, mineral ve tuz içeriklerinin de bu enzimler üzerinde etkili olduğu öngörülmektedir (Gagnaire ve ark., 2001).

4.3.3.3. β-kazein türevli peptidler

β-kazeinin kimozin ile hidrolizinin peynirlerde çok sınırlı olduğu ve genellikle sütün doğal enzimi olan plazmin enziminin aktivitesine bağlı olarak peynirlerde parçalandığı bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017; Taivosalo ve ark., 2018). Fox ve ark. (2017) kimozinin β-kazein üzerindeki bu sınırlı etkisi ile ilgili olarak, β-kazeinin diğer kazeinlere göre oldukça hidrofobik olması sonucu moleküler arası hidrofobik etkileşimlerin kimozine duyarlı bağların kimozin tarafından erişimini engelleyebileceğini bildirmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, sığır kimozinin β-kazeini sınırlı ölçüde hidrolize ettiği ve bu kimozinin β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan Lys (K)-Ser (S), Gln (Q)-Ser (S), Ala (A)-Phe (F) ve Leu (L)-Tyr (Y) bağlarını parçaladığı tespit edilmiştir (Møller ve ark., 2012). Ancak, bu araştırmacılar tarafından kimozin aktivitesi sonucu belirlenen β-kazein türevli peptidler Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmemiştir. Plazmin enziminin ise çoğunlukla lizin (K) ve arjinin (R) amino asitleri bulunan bağlarda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin enziminin aktivitesi ile çoğunlukla uzun amino asit zincirli β-kazein türevli peptidlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, plazmin enziminin β-kazeini genellikle N terminal bölgesinden hidrolize ettiği belirlenmiştir (Egito ve ark., 2003). Dolasıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-kazeinin N terminal bölgesinden belirlenen peptidler plazmin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir (Çizelge 4.24.).

Hurley ve ark. (2000) sütteki endojen bir diğer enzim olan katepsin D'nin de β-kazein üzerinde aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Katepsin D enziminin β-kazeini 13 farklı bölgeden hidroliz ettiği ve bu bölgelerin çoğunlukla β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan lösin, fenilalanin, triptofan ve serin amino asitlerine ait bağlardan oluştuğu tespit edilmiştir (Larsen ve ark., 1996). Plazmin ve katepsin D gibi sütte bulunan endojen enzimlere ek olarak, peynirlerin olgunlaşma süresince ortamdaki mikrobiyotaya ait proteolitik enzimler de β-kazeinin ileri derecede hidrolizinde görev alabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2013; Bounouala ve ark., 2017; Solieri ve ark., 2018). Koagülantta bulunan enzimlerin veya sütteki endojen enzimlerin aktivitesi ile meydana gelen uzun veya orta büyüklükteki peptidlerin mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalandığı ve oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olduğu bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996; Ardö ve ark., 2017).

Çizelge 4.24. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	3.928	608.3279	β-KN (62-66)	Ovine	DKIHP	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)					*
2	4.309	597.3116	β-KN (78-83)	Ovine	TGPIPN	ACE inhibitörü	Geerlings ve ark. (2006)				*	*
3	4.459	755.3967	β-KN (62-67)	Ovine	DKIHPF	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)	*	*	*	*	*
4	4.837	552.3232	β-KN (186-190)	Ovine	LPVPQ	DPP-4 inhibitörü, ACE inhibitörü	Cadee ve Mallee (2010); Nongonierma ve FitzGerald (2016)	*				
5	4.995	646.2810	β-KN (17-21)	Ovine	EQEEL	-	-		*	*	*	*
6	5.144	509.3167	β-KN (97-101)	Ovine	VVVPP	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006); Quirós ve ark. (2009)					*
7	14.302	1100.5611	β-KN (195-204)	Caprine	HQPPQPLSPT	-	**-**		*			
8	14.683	978.5120	β-KN (59-66)	Ovine	ELQDKIHP	ACE inhibitörü	van Elswijk ve ark. (2003)		*	*	*	*
9	15.204	1231.5981	β-KN (194-204)	Caprine	MHQPPQPLSPT	-	**-**	*	*	*	*	
10	15.436	1309.7149	β-KN (226-236)	Caprine	KVVPQRDMPIQ	-	-	*				
11	16.194	602.2720	β-KN (197-201)	Ovine	DMPIQ	Antioksidan	Di Pierro ve ark. (2014)		*	*	*	
12	16.808	1093.5411	β-KN (58-66)	Ovine	DELQDKIHP	-	-	*				
13	17.349	1175.5792	β-KN (121-129)	Ovine	HKEMPFPKY	-	**-**	*	*			
14	18.173	1091.6334	β-KN (181-190)	Ovine	SQPKVLPVPQ	-	**-**			*	*	*
15	18.630	651.3947	β-KN (185-190)	Ovine	VLPVPQ	-	**-**			*	*	*
16	18.706	996.5398	β-KN (60-67)	Ovine	LQDKIHPF	-	-		*	*		
17	19.546	1642.9743	β-KN (216-230)	Caprine	SQPKVLPVPQKVVPQ	-	**-**	*	*	*	*	
18	19.620	707.4191	β-KN (95-101)	Ovine	TPVVVPP	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)					*
19	19.697	1815.0666	β-KN (179-195)	Ovine	SLSQPKVLPVPQKAVPQ	-	-	*	*	*		
20	19.864	1132.5995	β-KN (138-147)	Ovine	QSLTLTDVEK	-	**-**		*	*	*	*
21	19.928	744.3813	β-KN (77-83)	Ovine	FTGPIPN	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
22	20.233	1125.5800	β-KN (59-67)	Ovine	ELQDKIHPF	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
23	20.230	825.4517	β-KN (212-219)	Ovine	GPVRGPFP	ACE inhibitörü	Hong ve ark. (2008)			*	*	*
24	20.458	917.5062	β-KN (141-148)	Ovine	TLTDVEKL	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2018)					*
25	20.534	1204.7184	β-KN (180-190)	Ovine	LSQPKVLPVPQ	-	-	*				
26	20.839	575.3427	β-KN (149-153)	Ovine	HLPLP	ACE inhibitörü	Sánchez-Rivera ve ark. (2016)	*	*	*		*

27	21.151	1843.0893	β-KN (214-230)	Caprine	SLSQPKVLPVPQKVVPQ	-	**-**	*					
28	21.220	1291.7443	β-KN (179-190)	Ovine	SLSQPKVLPVPQ	-	-	*	*	*	*	*	
29	21.299	963.5753	β-KN (181-189)	Ovine	SQPKVLPVP	-	-					*	
30	21.601	577.3119	β-KN (72-76)	Ovine	SLVYP	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)	*	*	*	*	*	
31	21.680	841.4336	β-KN (76-83)	Ovine	PFTGPIPN	-	-		*	*	*	*	
32	21.982	1240.6131	β-KN (58-67)	Ovine	DELQDKIHPF	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*	*	*	
33	22.135	1040.5078	β-KN (110-118)	Bovine	YPFPGPIHN	Opioid	Jinsmaa ve Yoshikawa (1999)			*			
34	22.287	587.2952	β-KN (130-134)	Ovine	PVEPF	-	-		*	*	*	*	
35	22.823	523.3384	β-KN (185-189)	Ovine	VLPVP	ACE inhibitörü	Huang ve ark. (2017)			*	*	*	
36	23.128	630.3370	β-KN (77-82)	Ovine	FTGPIP	-	**-**				*	*	
37	23.433	1163.6924	β-KN (179-189)	Ovine	SLSQPKVLPVP	-	-		*	*	*	*	
38	23.585	938.5335	β-KN (211-219)	Ovine	LGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)			*	*	*	
39	23.887	1744.8688	β-KN (121-134)	Ovine	HKEMPFPKYPVEPF	-	**-**	*	*				
40	23.890	940.5490	β-KN (210-218)	Ovine	VLGPVRGPF	-	**-**		*	*	*	*	
41	23.963	1380.7032	β-KN (76-88)	Ovine	PFTGPIPNSLPQN	-	**-**					*	
42	23.966	1404.8321	β-KN (178-190)	Ovine	LSLSQPKVLPVPQ	-	-					*	
43	24.118	1465.7373	β-KN (110-122)	Bovine	YPFPGPIHNSLPQ	Opioid	Jinsmaa ve Yoshikawa (1999)		*				
44	24.344	1025.5380	β-KN (109-117)	Bovine	VYPFPGPIH	Prolil endopeptidaz (PEP) inhibitörü	Asano ve ark. (1992)			*	*	*	
45	24.575	1037.6008	β-KN (210-219)	Ovine	VLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006); Quirós ve ark. (2007)		*	*	*	*	
46	25.414	938.5334	β-KN (212-220)	Ovine	GPVRGPFPI	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)		*	*	*	*	
47	25.414	1002.5867	β-KN (149-157)	Ovine	HLPLPLVQS	-	-					*	
48	25.639	1294.7033	β-KN (207-218)	Ovine	QEPVLGPVRGPF	İmmünomodülatör	Pisanu ve ark. (2015)					*	
49	25.715	1166.6441	β-KN (208-218)	Ovine	EPVLGPVRGPF	-	**-**		*	*	*	*	
50	25.642	783.4487	β-KN (84-90)	Ovine	SLPQNIL	-	-					*	
51	25.794	1245.6812	β-KN (138-148)	Ovine	QSLTLTDVEKL	-	-			*	*	*	
52	25.868	890.5229	β-KN (120-127)	Bovine	LPQNIPPL	DPP-4 inhibitörü	Uenishi ve ark. (2012)				*		
53	25.869	793.4698	β-KN (86-92)	Ovine	PQNILPL	-	**-**			*	*		
54	25.947	915.5538	β-KN (149-156)	Ovine	HLPLPLVQ	-	-				*	*	
55	26.096	1391.7559	β-KN (207-219)	Ovine	QEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)	*	*	*	*	*	
56	26.249	1263.7001	β-KN (208-219)	Ovine	EPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Hayes ve ark. (2007b)	*	*	*	*	*	
57	26.404	688.4269	β-KN (148-153)	Ovine	LHLPLP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007)	*	*	*	*	*	
58	26.633	1457.7681	β-KN (206-218)	Ovine	YQEPVLGPVRGPF	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)		*	*	*	*	
59	26.782	1138.6165	β-KN (108-117)	Bovine	LVYPFPGPIH	ACE inhibitörü	Pihlanto ve ark. (2010)	*	*	*	*	*	
60	26.937	529.2899	β-KN (216-220)	Ovine	GPFPI	Katepsin B inhibitörü	Lee ve Lee (2000)			*	*	*	
61	27.013	1554.8143	β-KN (206-219)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFP	-	-	*	*	*	*	*	
62	27.010	796.4489	β-KN (99-105)	Ovine	VPPFLQP	ACE inhibitörü	Ueno ve ark. (2004)					*	

63	27.087	820.3792	β-KN (197-203)	Ovine	DMPIQAF	Antienflamatuar	Altmann ve ark. (2016)					*	
64	27.161	1156.7304	β-KN (147-156)	Ovine	KLHLPLPLVQ	-	-	*					
65	27.392	1225.6480	β-KN (107-117)	Bovine	SLVYPFPGPIH	-	-			*	*	*	
66	27.544	656.3890	β-KN (97-102)	Ovine	VVVPPF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2009)				*	*	*
67	27.775	1051.6185	β-KN (211-220)	Ovine	LGPVRGPFPI	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017a)			*	*	*	*
68	28.080	1667.8976	β-KN (205-219)	Ovine	LYQEPVLGPVRGPFP	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017a)			*	*	*	*
69	28.385	1150.6847	β-KN (210-220)	Ovine	VLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*	*
70	28.610	1350.6642	β-KN (124-134)	Ovine	MPFPKYPVEPF	-	-				*	*	*
71	28.690	568.3583	β-KN (88-92)	Ovine	NILPL	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)					*	*
72	28.842	1083.5970	β-KN (93-102)	Ovine	TQTPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015)	*	*	*	*	*	*
73	28.991	854.4900	β-KN (95-102)	Ovine	TPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015)				*	*	*
74	29.147	1115.6722	β-KN (148-157)	Ovine	LHLPLPLVQS	-	-				*	*	*
75	29.299	1504.8336	β-KN (207-220)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*	*
76	29.375	637.3468	β-KN (73-77)	Ovine	LVYPF	-	-				*	*	*
77	29.601	1755.9210	β-KN (73-88)	Ovine	LVYPFTGPIPNSLPQN	-	-						*
78	29.604	1376.7719	β-KN (208-220)	Ovine	EPVLGPVRGPFPI	İmmünomodülatör	Kruzel (2011)	*	*	*	*	*	*
79	29.756	1780.9879	β-KN (204-219)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*	*
80	29.829	551.3693	β-KN (150-154)	Ovine	LPLPL	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)			*	*	*	*
81	29.830	1028.6371	β-KN (148-156)	Ovine	LHLPLPLVQ	-	-	*	*	*			
82	29.908	724.3817	β-KN (72-77)	Ovine	SLVYPF	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)	*	*	*	*	*	*
83	30.061	1667.9000	β-KN (206-220)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPI	Antibakteriyal	Birkemo ve ark. (2009)	*	*	*	*	*	*
84	30.210	1123.6271	β-KN (97-106)	Ovine	VVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik	Ohsawa ve ark. (2013)			*	*	*	*
85	30.363	801.5106	β-KN (148-154)	Ovine	LHLPLPL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)	*	*	*	*		
86	30.366	897.5346	β-KN (97-104)	Ovine	VVVPPFLQ	-	-						*
87	30.591	2403.3674	β-KN (93-114)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-						*
88	30.592	1164.6950	β-KN (211-221)	Ovine	LGPVRGPFPIL	-	-					*	*
89	30.670	1188.6617	β-KN (149-158)	Ovine	HLPLPLVQSW	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*	*	*	*
90	30.744	2073.2097	β-KN (96-114)	Ovine	PVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-						*

91	30.746	915.5506	β-KN (182-189)	Bovine	NLHLPLPL	Antikarsinojenik, ACE inhibitörü	Juillerat-Jeanneret ve ark. (2010); Robert ve ark. (2004)	*	*	*	*		
92	30.899	1550.8302	β-KN (93-106)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPE	Antioksidan	Farvin ve ark. (2010)	*	*	*	*	*	
93	30.973	1324.7440	β-KN (93-104)	Ovine	TQTPVVVPPFLQ	-	-			*			
94	30.974	1780.9885	β-KN (205-220)	Ovine	LYQEPVLGPVRGPFPI	Antioksidan	Ha ve ark. (2015)	*	*	*	*		
95	31.048	1321.7320	β-KN (95-106)	Ovine	TPVVVPPFLQPE	Antienflamatuar ve antioksidan	Bamdad ve ark. (2017)					*	
96	31.049	994.5891	β-KN (97-105)	Ovine	VVVPPFLQP	Antibakteriyal	Rana ve ark. (2018)				*	*	
97	31.201	1220.6816	β-KN (96-106)	Ovine	PVVVPPFLQPE	Antibakteriyal	Almaas ve ark. (2011)		*	*	*	*	
98	31.284	2516.4505	β-KN (92-114)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-	*					
99	31.432	1263.7700	β-KN (210-221)	Ovine	VLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*	
100	31.661	1421.7936	β-KN (93-105)	Ovine	TQTPVVVPPFLQP	-	-	*	*	*	*	*	
101	31.737	1663.9188	β-KN (92-106)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik	Ohsawa ve ark. (2013)					*	
102	31.887	1192.6860	β-KN (95-105)	Ovine	TPVVVPPFLQP	ACE inhibitörü	Abubakar ve ark. (1998)					*	
103	31.966	1617.9264	β-KN (207-221)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*	
104	32.191	1091.6383	β-KN (96-105)	Ovine	PVVVPPFLQP	-	-			*	*	*	
105	32.266	1489.8661	β-KN (208-221)	Ovine	EPVLGPVRGPFPIL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)	*	*	*	*	*	
106	32.344	1760.9722	β-KN (91-106)	Ovine	PLTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik	Uchida ve ark. (2012)				*	*	
107	32.347	1894.0730	β-KN (204-220)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPI	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*	
108	32.496	1534.8757	β-KN (92-105)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQP	-	-					*	
109	32.651	1780.9867	β-KN (206-221)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPIL	Hiperkolesterolemi önleyici, antioksidan	Mahdi ve ark. (2017); Mahdi ve ark. (2018)	*	*	*	*	*	
110	32.801	1406.8172	β-KN (90-102)	Ovine	LPLTQTPVVVPPF	-	-					*	
111	33.106	1631.9235	β-KN (91-105)	Ovine	PLTQTPVVVPPFLQP	-	-					*	
112	33.108	1196.6829	β-KN (93-103)	Ovine	TQTPVVVPPFL	-	-		*	*	*	*	
113	33.337	1301.7536	β-KN (148-158)	Ovine	LHLPLPLVQSW	-	-	*	*	*	*	*	
114	33.716	1028.6390	β-KN (182-190)	Bovine	NLHLPLPLL	-	-	*					
115	33.718	1663.9210	β-KN (93-107)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEI	-	-	*	*	*	*	*	
116	33.792	2085.1526	β-KN (123-141)	Bovine	NIPPLTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici	Ohsawa ve ark. (2018a)		*	*			
117	34.325	1333.7560	β-KN (96-107)	Ovine	PVVVPPFLQPEI	-	-			*	*	*	
118	34.404	1776.9948	β-KN (92-107)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPEI	-	-				*	*	
119	34.477	1519.8956	β-KN (89-102)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPF	-	-	*	*	*	*	*	
120	34.636	2007.1600	β-KN (204-221)	Ovine	LLYQEPVLGPVRGPFPIL	-	-	*					
121	34.785	1794.9573	β-KN (93-108)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIM	ACE inhibitörü	Pisanu ve ark. (2015)	*	*	*	*	*	

122	35.163	1987.1498	β-KN (89-106)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPE	-	-	*	*	*	*	*
123	35.392	1464.8084	β-KN (96-108)	Ovine	PVVVPPFLQPEIM	-	-			*	*	*
124	35.546	1908.0477	β-KN (92-108)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPEIM	-	-				*	*
125	35.711	1761.0407	β-KN (89-104)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQ	-	-		*	*	*	*
126	35.925	1858.0974	β-KN (89-105)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQP	-	-		*	*	*	*
127	36.842	2288.2804	β-KN (89-109)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEIMG	-	-	*				
128	36.916	1632.9815	β-KN (89-103)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFL	-	-			*	*	*
129	36.994	2231.2656	β-KN (89-108)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEIM	-	-			*	*	*
Toplam								**51**	**66**	**83**	**88**	**99**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: XP_010804480, XP_005681778, CAA34502). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, Opioid: Uyuşturucu, sakinleştirici, Prolil endopeptidaz (PEP) inhibitörü: unutkanlık önleyici, İmmünnomodülatör: bağışıklık sistemini düzenleyici, Antiamnezik: unutkanlık önleyici, Katepsin B: patolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır, Antienflamatuar: iltihap oluşumunu önleyici, Antikarsinojenik: kanser önleyici, Hiperkolesterolomi önleyici: kolesterol düşürücü.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.24.'te sunulmaktadır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 129 çeşit β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu değer, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}- (59 çeşit) ve α_{s2}-KN (11 çeşit) türevli peptidlerin sayısından oldukça yüksektir. Ayrıca, diğer yörelere ait tulum peynirlerine kıyasla en fazla β-KN türevli çeşidi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Bu durumun, farklı yörelere ait tulum peynirlerindeki aktif proteolitik sisteminin farklılığından kaynakladığı düşünülmektedir. Proteolitik sistemdeki farklılıklara peynir üretiminde kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonu, koagülant çeşidi ve miktarı, peynir mikrobiyotası ve üretim tekniği ile ilgili farklılıklar neden olmuş olabilir.

Gagnaire ve ark. (2001) fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) koagülant ve termofilik laktik asit bakterileri ve propiyonik asit bakterilerinden oluşan starterler kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 28 çeşit β-KN türevli peptid tanımlamışlardır. Bu çalışmaya ek olarak, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin 41 gün olgunlaşma süresince 215 çeşit β-KN türevli peptid tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar incelendiğinde, kullanılan koagülant türünün ve starter kültür çeşidinin β-KN türevli peptid sayısını etkilediği görülmektedir. Gómez-Ruiz ve ark. (2004) rennet, *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) starter kültürleri kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılması boyunca 17 çeşit β-KN türevli peptid belirlemişlerdir. Sagardia ve ark. (2013) çiğ koyun sütü kullanılarak üretilen Idiazabal peynirlerinin 4 ay olgunlaştırılması boyunca 65 çeşit β-KN türevli peptid gözlemlemişlerdir. Fontenele ve ark. (2017) kimozin kullanılarak çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde 74 çeşit β-KN türevli tanımlamışlardır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin 6 ay olgunlaşma süresince belirlenen β-KN türevli peptid sayısı Manchego, Coalho ve Idiazabal peynirlerinde belirlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Peynir üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda β-KN türevli peptid sayısında veya çeşidinde gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem uygulanıp uygulanmamasına, koagülant miktarına ve çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve olgunlaşma süresince farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı

olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda farklı β-KN türevli peptidlerin oluştuğu (Losito ve ark., 2006) ve peynir üretiminde süte uygulanan pastörizasyon işleminin β-KN türevli peptid sayısını azalttığı (Pisanu ve ark., 2015) bildirilmiştir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli DKIHPF, LQDKIHPF, DELQDKIHP, DELQDKIHPF, TPVVVPP, TPVVVPPF, TPVVVPPFLQPE, VVVPPFLQPE, HKEMPFPKYPVEPF, MPFPKYPVEPF, DMPIQAF, LLYQEPVLGPVRGPFP, LYQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPI ve GPVRGPFPI peptidleri sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin 41 gün olgunlaşma süresince de tanımlanmıştır (Sadat-Mekmene ve ark., 2013). Bu peptidlerin birçoğunun karboksipeptidaz ve aminopeptidaz aktivitesi ile oluştuğu görülmektedir. Idiazabal peynirlerinde tanımlanan LLYQEPVLGPVRGPFPI, LYQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPF, VLGPVRGPFPIL, LGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, GPVRGPFPI, GPVRGPFP, SLSQPKVLPVPQ, LSQPKVLPVPQ ve PFTGPIPN peptidlerine (Sagardia ve ark., 2013) Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Bu peptidlerin de genellikle karboksipeptidaz ve aminopeptidaz aktivitesine bağlı olarak meydana geldiği görülmektedir. Ayrıca, ELQDKIHPF, ELQDKIHP, YPFPGPIHNSLPQ, LLYQEPVLGPVRGPFPI, LYQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPI, HKEMPFPKYPVEPF ve MPFPKYPVEPF peptidleri hem Coalho hem de Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir (Fontenele ve ark., 2017). Caprino del Piemonte peynirinde belirlenen NILPL, LHLPLP ve GPVRGPFPI peptidlerine (Losito ve ark., 2006) ve 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde belirlenen DKIHPF, DKIHP, SLSQPKVLPVPQ, LPLPL, VLGPVRGPFP ve GPVRGPFPI peptidlerine de (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır. Bu çalışmadaki β-KN türevli peptidlere en fazla benzeyen peptidler Idiazabal ve Emmental peynirlerinde gibi gözükse de aslında Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde

tanımlanan β-KN türevli peptidlerin büyük bir çoğunluğu (yaklaşık %84'ü) Idiazabal ve Emmental peynirlerde tanımlanan β-KN türevli peptidlerden farklı bulunmuştur. Bu durum da Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin β-KN türevli peptid dinamiği açısından özgünlüğünü yansıtmaktadır.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (66) β-KN'in hidrofobik olan C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği ve bunu sırasıyla β-KN'in orta bölgesinden (46) ve N terminal bölgesinden (17) gelen peptidlerin takip ettiği belirlenmiştir. Diğer yörelere ait tulum peynirleri ile benzer şekilde, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, α_{s2}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden oluştuğu tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in orta bölgesinden çok daha fazla peptid meydana gelmiştir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısındaki yüksekliğe bu bölgeden gelen peptidlerin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden peptidlerin oluşumunda mikrobiyal proteolitik enzimler görev almış olabilir. Taivosalo ve ark. (2018) çeşitli laktik asit bakterilerine ait proteolitik enzimlerin β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerini içeren çeşitli bölgeleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak, β-KN'in orta bölgesinden meydana gelen peptid sayısının yörelere göre farklılık göstermesinin tulum peynirlerinde bulunan mikrobiyal proteolitik enzimlerin farklılığından kaynaklandığı öngörülmektedir. Lozo ve ark. (2011) laktobasillerde tanımlanan proteinazların özellikle β-KN'in C terminal bölgesini hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. β-KN'in N terminal bölgesinin mikrobiyal proteolitik enzimlerle gerçekleşen hidrolize karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Miclo ve ark., 2012; Chang ve ark., 2013). Ayrıca, bu peptidlerin oluşumunda sütteki endojen enzimlerin de görev aldığı düşünülmektedir. Plazmin enziminin β-KN'i genellikle N terminal bölgesinden hidrolize ettiği göz önünde bulundurulduğunda (Egito ve ark., 2003), Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal bölgesinden meydana gelen peptidler plazmin enziminin aktivitesi ile de meydana gelmiş olabilir. Bununla birlikte, sütün doğal diğer bir enzimi olan katepsin D'nin ise β-KN'in çoğunlukla C terminal bölgesini hidrolize ettiği düşünüldüğünde (Larsen ve ark., 1996), Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in C terminal

bölgesinden meydana gelen peptidler katepsin D enziminin aktivitesinden de kaynaklanmış olabilir.

Çeşitli peynirlerde, β-KN türevli peptidlerin farklı parçalanma bölgelerinden meydana geldiği görülmüştür. Idiazabal (Sagardia ve ark., 2013), Coalho (Fontenele ve ark., 2017) ve keçi peynirlerinde (Sommerer ve ark., 2001) β-KN'in daha çok C terminal bölgesinden meydana gelen peptidlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011), Emmental (Gagnaire ve ark., 2001; Sadat-Mekmene ve ark., 2013), Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2007) ve Old Saare (Taivosalo ve ark., 2018) peynirlerinde β-KN'in orta ve C terminal bölgelerine kıyasla N terminal bölgesinden daha yüksek sayıda β-KN türevli peptid meydana geldiği belirlenmiştir. Peynir çeşitlerine bağlı olarak meydana gelen β-KN türevli peptid modellerinde gözlemlenen bu farklılıklar aktif proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Swaisgood (2003) β-KN'in ilk 21 amino asit R gruplarını içeren bölgenin hidrofilik olduğunu ve bu bölgeyi takip eden bölgenin ise hidrofobik özellik gösterdiğini bildirmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, hidrofilik bölgeden gelen β-KN (17-21) dışındaki tüm β-KN türevli peptidler hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. Bu yöreye ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'in de çoğunlukla hidrofobik bölgelerinden parçalandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, α_{s1}- ve β-KN'deki hidrofobik bölgelerin peynirde mevcut proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Hidrofobik bölgeden meydana gelen β-KN türevli peptidlerin 58-221 amino asitleri arasında bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde, Miclo ve ark. (2012) tarafından β-KN'in 57-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara, Sadat-Mekmene ve ark. (2011) tarafından β-KN'in 28-207 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara ve Chang ve ark. (2013) tarafından β-KN'in 127-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *B. longum*'a ait proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha hassas olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, mikrobiyal proteolitik enzimlerin β-KN'in daha çok hidrofobik bölgelerini etkilediği görülmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan β-KN türevli peptidlerin 5-23 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli bu peptidlerin α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha uzun zincirli olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlerden farklı

olarak 15-23 amino asit uzunluğuna sahip 26 β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu durumun, peynirdeki proteolitik enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN'ler üzerindeki aktivitelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde uzun peptidlerin, genellikle β-KN'in orta bölgesinden geldiği ve bunu C terminal bölgesinin takip ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kısa zincirli peptidlerin ise β-KN'in tüm bölgelerinden meydana geldiği gözlemlenmiştir. 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 3-20 (Gagnaire ve ark., 2001), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 5-12 (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 9-24 (Gagnaire ve ark., 2011), 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 (Sagardia ve ark., 2013) ve Coalho peynirlerinde 7-26 (Fontenele ve ark., 2017) amino asit uzunluğuna sahip β-KN türevli peptidlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptidlerde pentapeptidlerin ve undekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu nonapeptidlerin ve dekapeptidlerin takip ettiği görülmüştür. Diğer taraftan, 18-23 amino asit uzunluğuna sahip peptidlerin ise bu peptidlere kıyasla daha az olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde de β-KN türevli pentapeptidlerin baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde β-KN türevli pentapeptidlerin baskın olduğu belirlenmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2004).

Birkemo ve ark. (2009) β-KN'in hidrolizi ile antibakteriyal özellikli kazesidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI) ve kazesidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV-sığır, YQEPVLGPVRGPFPILV-koyun ve keçi) peptidlerinin meydana geldiğini belirtmiştir. β-KN türevli kazesidin 15 peptidine 180 günlük olgunlaşma süresince Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ancak, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde gözlemlenen kazesidin 17 peptidi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmemiştir. Diğer taraftan, bu kazesidin peptidlerinin hidroliz ürünü olan 20 peptidin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler; GPFPI, GPVRGPFPI, GPVRGPFP, LGPVRGPFP, LGPVRGPFPI, LGPVRGPFPIL, VLGPVRGPF, VLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPF, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPF, QEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPF, YQEPVLGPVRGPFP ve YQEPVLGPVRGPFPIL sekanslarından oluşmaktadır. Kazesidinlerin parçalanma ürünleri olan bu peptidlerin aminopeptidaz, karboksipeptidaz, dipeptidaz (Glu-Pro) ve endopeptidaz aktivitelerine bağlı olarak meydana geldiği

görülmektedir. Bu enzimlerin, peynirlerde bulunan mikrobiyotaya ait enzimler olduğu düşünülmektedir. Karaman ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde kazesidin türevli peptid sayısı yakın bulunurken, bu bölgelere ait tulum peynirlerinde kazesidin türevli peptid sayısı Anamur yöresine ait tulum peynirlerinkinden yüksek bulunmuştur. Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılığın peynir mikrobiyotasındaki farklılıklardan kaynaklandığı öngörülmektedir.

Çeşitli mikrobiyal hücre duvarı ilişkili proteinazlar ile β-KN'in parçalanması sonucu antihipertansif beta kazokinin 7 (AVPYPQR) ve 10 (YQQPVLGPVR) peptidlerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Meisel ve Bockelmann, 1999). Ancak, β-KN türevli bu peptidlere Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmamıştır. Ayrıca, β-KN'in hidrolizi ile opioid özellikli β-kazomorfin 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 13 gibi β-kazomorfinlerin meydana geldiği rapor edilmiştir (Jinsmaa ve Yoshikawa, 1999; Nguyen ve ark., 2015). Bu opioid peptidler arasından β-kazomorfin 7'nin (YPFPGPI) tip I diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırdığı için insan hastalıklarının gelişiminde bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Nguyen ve ark., 2015). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde bu opioid peptidlerden β-kazomorfin 9 (YPFPGPIHN) ve β-kazomorfin 13 (YPFPGPIHNSLPQ) tespit edilmiştir ve bu tulum peynirlerinin β-kazomorfin 7 bakımından sağlık riski taşımadığı belirlenmiştir.

Demirci (2019) 180 günlük olgunlaşma süresinin başında Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde *Lc. lactis* suşlarının baskın olarak bulunduğunu, olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde ise *E. faecium* suşlarının baskın olduğunu ve bu olgunlaşma süresince peynirlerde *E. faecalis, E.hirae, E. durans, S. thermophilus, L. plantarum, L. brevis* ve *Lc. garvieae* suşlarının da bulunduğunu belirlemiştir. Bu mikrobiyotaya ait hücre içi ve hücre dışı enzimlerin Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in türevli peptidlerin oluşumunda önemli bir paya sahip olduğu düşünülmektedir. Çizelge 4.24. incelendiğinde, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen çoğu β-KN türevli peptidin karboksipeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz ve endopeptidaz aktivitesi sonucu meydana geldiği görülmektedir. Bu enzimlerin, tulum peynirin mikrobiyotasından kaynaklandığı öngörülmektedir. Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden farklı olarak Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde *S. thermophilus* ve *Lc. garvieae* suşları tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu farklı mikrobiyotaya sahip proteolitik enzimler diğer yörelere ait tulum peynirlerine kıyasla Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in türevli peptidlerin daha fazla miktarda meydana gelmesine neden olmuş olabilir.

Miclo ve ark. (2012) fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}- ve α_{s2}-KN'lere kıyasla özellikle β-KN üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesi ile belirlenen β-KN türevli HKEMPFPKYPVEPF, NLHLPLPL, LPLPL, VLPVPQ, LPVPQ, DMPIQAF, YQEOVLGPVRGPFP ve GPVRGPFP peptidlerine Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, Moreno-Montoro ve ark. (2018) tarafından *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde β-KN'in C terminal bölgesinden belirledikleri LLYQEPVLGPVRGPFPIL ve YQEPVLGPVRGPFPIL peptidleri de Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir.

Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi sonucu β-KN türevli TQTPVVVPPF, VVVPPF, FTGPIPN, LHLPLPL, LHLPLP ve LLYQEPVLGPVRGPFP peptidlerini meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile SLVYPF, FTGPIPN, LLYQEPVLGPVRGPFPI, LHLPLPL ve TPVVVPPF peptidlerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. β-KN türevli tüm bu peptidler, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Requena ve ark. (1993) ise geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının hücre duvarı ilişkili proteinaz aktivitesinin α_{s1}-KN'e kıyasla daha çok β-KN üzerinde gerçekleştiğini ve *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar ilgili suşlar arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini ise *L. plantarum* suşlarında belirlemişlerdir.

Igoumenidou ve ark. (2005) Feta peynirinden izole edilen *E. durans* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'e kıyasla β-KN'i daha hızlı hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Veljovic ve ark. (2009) ise *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre dışı proteinazların β-KN üzerinde çok yüksek veya orta derecede aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, Quirós ve ark. (2007) ve Gútiez ve ark. (2013) *E. faecalis* suşları ile fermente edilen sütlerde β-KN türevli VLGPVRGPFP, VVVPPF, LHLPLPL ve LHLPLP peptidlerinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu peptidler de Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir.

E. durans, E. faecium, E. faecalis, Lc. lactis ve *S. thermophilus* ile gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde (Requena ve ark., 1993; Igoumenidou ve ark., 2005; Veljovic ve ark., 2009; Miclo ve ark., 2012), genellikle bu mikroorganizmalara ait proteolitik

enzimlerin α_{s1}- ve α_{s2}-KN'lere kıyasla daha çok β-KN üzerinde aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu mikroorganizmaların Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de bulunduğu bildirilmiştir (Demirci, 2019). Dolayısıyla, bu durum Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha fazla β-KN türevli peptidlerin bulunmasını açıklamaktadır.

Theriot ve ark. (2009) bir dipeptidaz olan mikrobiyal prolidazların sonunda prolin bulunan dipeptidleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Christensen ve ark. (1999) *Lc. lactis* suşlarının da prolidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla, *Lc. lactis* suşlarına ait prolidaz enzimlerinin EPVLGPVRGPFPIL peptidinin EP dipeptidi üzerindeki aktivitesine bağlı olarak beta kazesidin türevli VLGPVRGPFPIL peptidi meydana gelmiş olabilir.

Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* suşlarında aminopeptidaz (PepA, PepC, PepM, PepN ve Pep S), prolinaz (PepP, PepQ ve PepX), dipeptidaz (PepV, PepXP), tripeptidaz (PepT) ve endopeptidaz (PepO) genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. PepA aminopeptidazının amino ucunda bulunan aspartik asit (D) ve glutamik asit (E) gibi asidik amino asitleri, PepC aminopeptidazının amino ucunda bulunan arjinin (R), histidin (H), lizin (K), glutamik asit (E), aspartik asit (D), alanin (A), lösin (L) ve fenilalanin (F) amino asitlerini, PepN aminopeptidazının amino ucunda bulunan özellikle bazik lizin (K) ve arjinin (R) ile hidrofobik/yüksüz lösin (L) ve alanin (A) amino asitlerini, PepM aminopeptidazının amino ucunda bulunan metiyonin (M) amino asidini ve PepS aminopeptidazının amino ucunda bulunan arjinin (R) amino asidini veya fenilalanin (F), triptofan (W) ve tirozin (Y) gibi aromatik amino asitleri hidrolize ettiği bildirilmiştir (Christensen ve ark., 1999; Thomas ve ark., 2010).

Herreros ve ark. (2003) İspanyol Armada peynirinden izole edilen *L. plantarum* ve *L. brevis* suşlarına ait proteolitik enzimlerin alanin, lizin ve lösin bağları üzerinde yüksek düzeyde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis* suşuna ait hücre içi proteolitik enzimlerin alanin, arjinin, lösin, lizin ve metiyonin amino asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlerken, *E. faecium* suşuna ait hücre içi proteolitik enzimlerin ise arjinin ve metiyonin asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, González ve ark. (2010) İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin lizin, lösin, alanin ve prolin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Serio ve ark. (2010) Pecorino

Abruzzese peynirinden izole edilen *E. durans* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre içi enzimlere kıyasla arjinin (R) ve lizin (K) amino asitlerine ait bağlar üzerinde daha yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda aspartik asit (D), glutamik asit (E), lösin (L), valin (V), glutamin (Q), metiyonin (M), tirozin (Y) ve prolin (P) amino asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsedilen aminopeptidaz aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen *S. thermophilus, Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis, E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarına (Demirci, 2019) ait proteolitik enzimler bu tulum peynirlerinde β-KN türevli peptidlerin oluşumunda gözlemlenen aminopeptidaz aktivitelerinden sorumlu olabilir.

Hafeez ve ark. (2015) *S. thermophilus* LMD-9 suşuna ait hücre dışı proteolitik enzimlerin arjinin (R) ve lizin (K) amino asitlerine ait bağlarda karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Deutsch ve ark. (2000) *S. thermophilus* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin C terminalinde bulunan lösin ve asparajin amino asitlerine ait bağlar üzerinde karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Herreros ve ark. (2003) ise İspanyol Armada peynirinden izole edilen *Lc. lactis* ve *L. brevis* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerinin C terminalinde bulunan lösin (L) amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini ve bu amino asit üzerinde *Lc. lactis*'e ait enzimlerin daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise, Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis, L. paracasei* ve *E. faecium* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin arjinin (R) ve fenilalanin (F) bağlarında karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğunu ve bu suşlar arasında en yüksek karboksipeptidaz aktivitesini *E. faecium* suşunun gösterdiğini tespit etmişlerdir. González ve ark. (2010) İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 ve *E. faecalis* GE 2320 suşlarının *Leu. mesenteroides, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla C terminalinde bulunan lösin amino asidine karşı daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, *Lc. lactis* GE 2363 suşunun *L. plantarum, L. paracasei* ve *E. faecalis* suşlarına kıyasla daha yüksek dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Kariyama ve ark. (1990) *E. hirae* ATCC 9790 suşuna ait

hücre duvarı ilişkili proteolitik enzimlerin C terminalinde bulunan alanin (A) amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini ileri sürmüşlerdir..

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda C terminal bölgesinde bulunan fenilalanin (F), prolin (P), lösin (L), izolösin (I), metiyonin (M), asparajin (N), glutamik asit (E) ve glisin (G) amino asitlerine ait bağlarda karboksipeptidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsedilen karboksipeptidaz aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen *S. thermophilus, Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis, E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına (Demirci, 2019) ait proteolitik enzimler bu tulum peynirlerinde β-KN türevli peptidlerin oluşumunda fenilalanin, lösin ve asparajin amino asitlerine ait bağlarda gözlemlenen karboksipeptidaz aktivitelerinden sorumlu olabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak gerçekleşen proteolize bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Olgunlaşma süresinin başında 51 β-KN türevli peptid belirlenirken, 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise 99 β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda β-KN türevli peptid sayısında artış en fazla Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenirken, bunu sırasıyla Karaman ve Anamur yöresine ait tulum peynirler takip etmiştir. Yöreler arasında en fazla β-KN türevli peptid çeşitliliği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde görülmesine rağmen, olgunlaşma süresi boyunca β-KN türevli peptid sayısındaki artışın Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha yüksek olmasının bu yöreye kıyasla Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında çok daha yüksek miktarda β-KN türevli peptidin meydana gelmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum, yörelere göre tulum peynirlerinde değişen proteolitik sistem aktivitesini göstermektedir.

Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde, Manchego peynirlerinde 8 aylık olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid sayısında artış gözlemlendiği tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Mikrobiyal rennet ve starter kültürler (mezofilik ve termofilik) kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Old Saare peynirlerinde ise β-KN türevli peptid miktarının olgunlaşma süresinin 3. ayına kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 8. ayına kadar azaldığı, ancak, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 8. ayında daha yüksek miktarda β-KN türevli peptid bulunduğu gözlemlenmiştir (Taivosalo ve ark., 2018). Ayrıca, sıvı buzağı renneti ve *L. helveticus*, *S.*

thermophilus ve propiyonik starter bakteriler kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 13. gününe kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 40. gününde azaldığı bildirilmiştir, ancak, olgunlaşma süresinin 40. günündeki peptid sayısı olgunlaşma süresinin başından yüksek bulunmuştur (Sadat-Mekmene ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada ise, pıhtısı haşlanan Ragusano peynirinde 7 aylık olgunlaşma süresi ile birlikte β-KN türevli peptid sayısının azaldığı belirlenmiştir (Gagnaire ve ark., 2011). Peynir çeşitlerine bağlı olarak olgunlaşma süresi boyunca β-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, bazı peptidlerin peynirde akümüle olması, bazı peptidlerin hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ve bazılarının ise amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması ile açıklanabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 129 farklı çeşitte β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 32 peptidin, DKIHPF, ELQDKIHPF, DELQDKIHPF, FTGPIPN, HLPLP, LHLPLP, HLPLPLVQSW, LHLPLPLVQSW, LVYPFPGPIH, SLSQPKVLPVPQ, SLVYP, SLVYPF, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPIL, LLYQEPVLGPVRGPFP, LLYQEPVLGPVRGPFPI, TQTPVVVPPF, TQTPVVVPPFLQP, TQTPVVVPPFLQPE, TQTPVVVPPFLQPEI, TQTPVVVPPFLQPEIM, ILPLTQTPVVVPPF ve ILPLTQTPVVVPPFLQPE, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerin arasında kazesidin 15 peptidinin de bulunduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresinin farklı günlerinde korunmuş peptidlerden bazılarının hidroliz ürünleri de belirlenmiştir ve bu korunmuş peptidlerin olgunlaşma süresince devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla daha fazla korunmuş peptid tespit edilmiştir. Bu durum, β-KN türevli peptid çeşidinin Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla olmasıyla ilişkilendirilebilir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptidlerden 12 tanesi Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ancak, bu yörelerden farklı olarak yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli 11 peptidin olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu belirlenmiştir. Korunmuş peptidlerde gözlemlenen bu

değişimlerin tulum peynirlerindeki proteolitik enzimlerin çeşitliliğinden ve aktivitelerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu farklılıklar da peynir üretim metoduna ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olmaktadır.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde, korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in C terminal bölgesinden (18 adet) meydana geldiği, diğerlerinin ise β-KN'in orta (8 adet) ve N terminal (6 adet) bölgelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) da Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca devamlı bulunan peptidlerin çoğunlukla C terminal bölgesinden meydana geldiğini ve β-KN'in N terminal ve orta bölgelerinden bazı peptidlerin de olgunlaşma süresi boyunca bulunduğunu tespit etmiştir. Gómez-Ruiz ve ark. (2007) ise geleneksel olarak üretilen Manchego peynirlerinin 8 ay olgunlaşma süresi boyunca β-KN'in N terminal bölgesinden gelen 4 peptidinin devamlı bulunduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) 40 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde β-KN türevli 32 peptidin devamlı bulunduğunu ve bu peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in N terminal bölgesinden geldiğini tespit etmişlerdir. Peynir çeşitlerine göre korunmuş peptidlerde gözlemlenen bu farklılıkların peynir üretim metoduna bağlı olarak proteolitik sistemin etkinliğinin farklı olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli bu korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (25 adet) hidrofobik amino asitlerle bittiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde β-KN (62-67) (DKIHPF), β-KN (72-76) (SLVYP), β-KN (93-102) (TQTPVVVPPF), β-KN (149-153) (HLPLP) ve β-KN (210-219) (VLGPVRGPFP) sekanslarını içeren korunmuş bölgelerin de bulunduğu fark edilmiştir. Old Saare peynirinin 8 aylık olgunlaşma süresi boyunca genellikle β-KN türevli fosfopeptidlerin biriktiği yani korunduğu tespit edilmiştir (Taivosalo ve ark., 2018). Proteinlerde fosforilizasyonun protein kinaz enzimi vasıtasıyla serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitlerine fosfat grubunun eklenmesiyle meydana geldiği bildirilmiştir (Chalmers ve ark., 2004). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde fosfopeptidler ayrıca belirlenmemiştir, ancak, olgunlaşma süresince korunmuş β-KN türevli peptidlerin bazılarında serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitleri görülmüştür. Dolayısıyla, bu peptidlerde de fosforilizasyon gerçeklemiş olabilir.

Biyoaktif peptidlerin kısa zincirli peptidlerden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda (Hartmann ve Meisel, 2007), Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin biyoaktif özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen β-KN türevli

bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, opioid, antienflamatuar, antikarsinojenik, prolil endopeptidaz (PEP) inhibitörü, beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik olmak üzere 13 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Biyolojik aktivite gösteren peptidler arasında en fazla ACE inhibitörü peptidlere rastlanmış olup bunu sırasıyla antioksidan, antibakteriyal ve DPP-4 inhibitörü peptidler takip etmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla β-KN türevli peptidlerde daha çeşitli biyolojik aktivite görülmüştür. Ayrıca, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde fonksiyonel özellik gösteren β-KN türevli peptid çeşitliliği Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinkinden daha yüksek bulunmuştur.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli 31 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir ve β-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısı α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısından daha yüksek bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile farklı ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği Çizelge 4.24.'ten de görülmektedir. Karaman yöresinde belirlenen β-KN türevli antihipertansif peptidler; DKIHP, DKIHPF, ELQDKIHP, DELQDKIHPF, TGPIPN, FTGPIPN, LPVPQ, VVVPP, VVVPPF, TPVVVPPFLQP, TQTPVVVPPFLQPEIM, VPPFLQP, TLTDVEKL, HLPLP, LHLPLP, LHLPLPL, NLHLPLPL, HLPLPLVQSW, SLVYP, SLVYPF, VLPVP, LVYPFPGPIH, LGPVRGPFP, GPVRGPFP, VLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPF, LLYQEPVLGPVRGPFP ve LLYQEPVLGPVRGPFPI peptidlerinden oluşmaktadır. Antihipertansif bu peptidlerin çoğunluğu β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelmiştir. Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesiyle oluşan LHLPLPL, LHLPLP, VVVPPF, FTGPIPN, LLYQEPVLGPVRGPFPI ve LLYQEPVLGPVRGPFP peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. QEPVLGPVRGPFP ve LGPVRGPFP peptidlerinin %98.61 ACE inhibisyonu gösterdiği bildirilmiştir (Villegas ve ark., 2014). VLGPVRGPFP, VVVPPF, LHLPLP ve LHLPLPL peptidlerinin sırasıyla 137, >1500, 5.5 ve 425 µM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Quirós ve ark., 2007). DKIHP ve DKIHPF peptidlerinin ise sırasıyla 113.1 ve 2419.4 µM'lık IC_{50} değeri ile antihipertansif etki gösterdiği bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006). TGPIPN peptidinin 316 µM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Geerlings ve ark., 2006). SLVYP peptidinin ise 40 µM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir (Kohmura ve ark., 1990).

Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik prolin amino asidi bulunan peptidlerin fenilalanin amino asidi bulunduranlara kıyasla daha yüksek ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonunda prolin ve fenilalanin amino asitlerini bulunduran β-KN türevli ACE inhibitörü peptidler Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Hatta sonunda prolin amino asidi bulunduran antihipertansif peptidlerin sonunda fenilalanin amino asidi bulunduranlardan daha yüksek sayıda olduğu görülmüştür. Antihipertansif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin 26 tanesinde fenilalanin (F), prolin (P), izolösin (I), lösin (L) ve metiyonin (M)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, HLPLPLVQSW peptidi dışındaki diğer ACE inhibitörü peptidlerin C terminal ucundaki son üç amino asitten birinin hidrofobik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, ACE inhibitörü peptidlerin prolin, lizin ve aromatik amino asitleri (fenilalanin, triptofan ve tirozin) içerdiği bildirilmiştir (Suetsuna ve Nakano, 2000; Aslam ve ark., 2019). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin de bu amino asitleri içerdiği gözlemlenmiştir.

Olgunlaşma süresinin başında gözlemlenen antihipertansif LPVPQ peptidinin insülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik de gösterdiği bildirilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2016). Yani bu peptid, multifonksiyonel bir peptiddir. Hem ACE inhibitörü hem de antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu belirlenen (Robert ve ark., 2004; Juillerat-Jeanneret ve ark., 2010) diğer bir multifonksiyonel peptid olan NLHLPLPL peptidi ise olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* türlerinin aktivitesi ile meydana gelen bu peptidin kolon kanserini önlediği bildirilmiştir (Juillerat-Jeanneret ve ark., 2010). DPP-4 inhibitörü özellik gösteren diğer LGPVRGPFPI, LYQEPVLGPVRGPFP ve LPLPL peptidleri olgunlaşma süresinin 30., 60., 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. Gene DPP-4 inhibitörü peptidlerden olan LPQNIPPL yalnızca olgunlaşma süresinin 90. gününde gözlemlenirken, TPVVVPP peptidi ise olgunlaşma süresinin sonunda gözlemlenmiştir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen antioksidan peptidler ise DMPIQ, TQTPVVVPPF, TPVVVPPF, TQTPVVVPPFLQPE, TPVVVPPFLQPE, YQEPVLGPVRGPFPIL ve LYQEPVLGPVRGPFPI peptidlerinden oluşmaktadır. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin (Y) amino asitlerini

içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmiştir. Bu durum, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli antioksidan peptidlerin fenilalanin, prolin, tirozin gibi hidrofobik amino asitleri içermesi ve bir antioksidan peptidin N terminal ucunda lösin amino asidinin bulunması ile tutarlılık göstermektedir. TQTPVVVPPF ve TQTPVVVPPFLQPE peptidleri tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ayrıca, olgunlaştırma süresinin tüm gününde gözlemlenen antioksidan YQEPVLGPVRGPFPIL peptidinin ise hiperkolesterolomi önleyici özelliğe sahip olduğu da bildirilmiştir (Mahdi ve ark., 2017). DMPIQ olgunlaşma süresinin 30., 60, ve 90. günlerinde belirlenirken, TPVVVPPF peptidi ise olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. LYQEPVLGPVRGPFPI peptidi ise olgunlaşma süresinin 180. günü dışındaki tüm günlerde tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin yalnızca son gününde gözlemlenen TPVVVPPFLQPE peptidinin ayrıca antienflamatuar özellik gösterdiği bildirilmiştir (Bamdad ve ark., 2017).

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan antibakteriyal peptidlerden ELQDKIHPF ve YQEPVLGPVRGPFPI peptidleri tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ayrıca, antibakteriyal GPVRGPFPI ve PVVVPPFLQPE peptidleri olgunlaşma süresinin 7. günü dışındaki tüm olgunlaşma günlerinde tespit edilirken, antibakteriyal VVVPPFLQP ve NILPL peptidleri ise olgunlaşma süresini 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. YQEPVLGPVRGPFPI peptidinin, yani kazesidin 15 peptidinin *E. coli* DH5α, *E. coli* DPC6053 ve *Enterobacter sakazakii* DPC5120 suşlarına karşı sırasıyla 0.5, 0.4 ve >1.0 mg/mL'lik MIC değeri ile antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009). NILPL, GPVRGPFPI ve ELQDKIHPF peptidlerinin ise *Lactobacillus sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği bildirilmiştir (Losito ve ark., 2006). VVVPPFLQP peptidinin *E. coli* ATCC 25922 suşunun gelişimini inhibe ettiği (Rana ve ark., 2018) ve PVVVPPFLQPE peptidinin *E. coli* K12, *B. cereus* RT INF01 ve *L. monocytogenes* suşlarının gelişimini inhibe ettiği (Almaas ve ark., 2011) tespit edilmiştir.

Sakinleştirici veya uyuşturucu özellik gösteren YPFPGPIHNSLPQ (β-kazomorfin 13) ve YPFPGPIHN (β-kazomorfin 9) peptidleri sırasıyla olgunlaşma süresinin yalnızca 30. ve 60. günlerinde belirlenmiştir. YPFPGPIHN peptidi YPFPGPIHNSLPQ peptidinin hidrolize olması ile meydana gelmiştir ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde bu peptidler ileri derecede hidroliz olmuştur. İmmünomodülatör özellik gösteren EPVLGPVRGPFPI peptidi tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenirken, diğer bir immünomodülatör peptid olan QEPVLGPVRGPF peptidi ise

yalnızca olgunlaşma süresinin sonunda belirlenmiştir. EPVLGPVRGPFPI peptidinin immünolojik hastalıkların, özellikle astımın önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olduğu bildirilmiştir (Kruzel, 2011).

Olgunlaşma süresinin 90. gününde antienflamatuar özellik gösteren DMPIQAF peptidinin meydana geldiği belirlenmiştir. Bu peptidin böbrek hücrelerinde antienflamatuar özellik gösterdiği bildirilmiştir (Altmann ve ark., 2016). Ayrıca, protein düzensizliğine bağlı olarak yetersiz kas gelişimi, kemik erimesi ve tümör metastazı (yayılması) gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol alan ve lizozomal sistein proteazlardan biri olan katepsin B'yi inhibe eden (Lee ve Lee, 2000) GPFPI peptidi olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde tespit edilmiştir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde beyin fonksiyonlarını artıran ve unutkanlığı önleyen VVVPPFLQPE, LTQTPVVVPPFLQPE, PLTQTPVVVPPFLQPE ve NIPPLTQTPVVVPPFLQPE peptidlerinin de bulunduğu belirlenmiştir. VVVPPFLQPE peptidi olgunlaşma süresinin 7. günü dışındaki tüm olgunlaşma günlerinde belirlenmiştir. NIPPLTQTPVVVPPFLQPE peptidi olgunlaşma süresinin 30. ve 60. günlerinde belirlenmiştir. Diğer beyin fonksiyonlarını artıran ve unutkanlığı önleyen peptidlerin bu peptidinin hidrolizi ile meydana geldiği görülmüştür. PLTQTPVVVPPFLQPE peptidi olgunlaşma süresinin 90. ve 180 günlerinde belirlenmiştir. LTQTPVVVPPFLQPE peptidinin ise olgunlaşma süresinin sonunda meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu peptidlere ek olarak, olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde belirlenen VYPFPGPIH peptidinin 110 μM'lık IC_{50} değeri PEP enzimini inhibe ederek unutkanlığı önlediği bildirilmiştir (Asano ve ark., 1992).

4.3.3.4. κ-kazein türevli peptidler

κ-kazeinin rennet ile parçalanması sonucu C terminal ucundan hidrofilik glikomakropeptid ya da diğer adıyla kazeinomakropeptid ve N terminal ucundan hidrofobik *para*-κ-kazein meydana gelmektedir (Manguy ve Shields, 2019). Genel olarak, hidrofilik glikomakropeptid peynir altı suyu ile uzaklaşırken, peynirde *para*-κ-kazein bulunmaktadır. Peynirde kalan *para*-κ-kazeinin kimozin ile ileri derecede hidrolize olmadığı ancak sütün doğal enzimleri veya mikrobiyal enzimler vasıtasıyla olgunlaşma sırasında peynirde düşük miktarda hidrolize olabileceği bildirilmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1993). Law ve Haandrikman (1997) laktokok hücrelerinde

bulunan P_{III}-tipi proteinazların (laktosepin) κ-kazeini hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, Larsen ve ark. (1996) sütün doğal enzimi olan katepsin D'nin de κ-kazeinden glikomakropeptidi meydana getirme yeteneğine sahip olduğunu ve ayrıca katepsin D'nin *para*-κ-kazeini Leu-Ser bağlarından ileri derecede hidroliz ettiğini rapor etmişlerdir. Dalsgaard ve ark. (2008) plazminin κ-kazeini hidrofobik *para*-κ-kazein bölgesinden hidrolize ettiğini ve FFSDK, FFSKIAK, SPAQILQWQVLSNTVPAK ve YIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAKPAAVR peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya ek olarak, Manguy ve Shields (2019) plazmin ile *para*-κ-kazeinin glikomakropeptidden daha fazla parçalanma bölgeleri olduğunu bildirmişlerdir ve bunu amino asit içerikleriyle ilişkilendirmişlerdir. İlgili araştırmacılar plazmin enziminin aktif olduğu arjinin (R) amino asidinin *para*-κ-kazeinde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bahsedilen çalışmada lösin (L) ve tirozin (Y) amino asitlerinin glikomakropeptide kıyasla *para*-κ-kazeinde çok yüksek oranda bulunduğunu belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu bağlar üzerinde etkili katepsin D enziminin *para*-κ-kazein hidrolizinde rol alabileceği düşünülebilir (Larsen ve ark., 1996).

Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan κ-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.25.'te sunulmaktadır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 4 çeşit κ-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Bu peptidlerden 3 tanesinin κ-KN'in hidrofobik bölgesinden ve 1 tanesinin ise κ-KN'in hidrofilik bölgesinden geldiği tespit edilmiştir. Hidrofobik bölgedeki peptidlerin, genellikle *para*-κ-kazeinin C terminal bölgesine yakın bölgelerden meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte hidrofilik bölgeden meydana gelen peptidin ise glikomakropeptidin N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. Coalho (Fontenele ve ark., 2017), Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) ve Emmental (Gagnaire ve ark., 2001) peynirlerinde de κ-KN'in hidrofobik bölgesinden meydana gelen peptidler belirlenmiştir. Peynir üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda genellikle κ-KN'in hidrofobik bölgesinden peptidlerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak, keçi peynirlerinde (Sommerer ve ark., 2001) ve Idiazabal peynirlerinde (Sagardia ve ark., 2013) κ-KN'in hidrofobik bölgesine ek olarak hidrofilik bölgesinden de peptidlerin meydana geldiği belirlenmiştir. κ-KN'in hidrofilik bölgesinden peptidlerin gözlemlenmesi üretim sırasında yeterince peynir altı suyunun uzaklaştırılmamasına bağlı olabilir.

Çizelge 4.25. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan κ-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	15.216	569.3167	κ-KN (98-102)	Caprine	QVLPN	-		*	*			
2	19.940	756.4014	κ-KN (139-145)	Ovine	EIPAINT	-			*			
3	20.916	632.3514	κ-KN (47-51)	Bovine	IPIQY	DPP-4 inhibitörü, antioksidan	Nongonierma ve FitzGerald (2014)	*	*	*		
4	22.592	651.3246	κ-KN (77-81)	Bovine	LPYPY	ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü, antioksidan	Gómez-Ruiz ve ark. (2007); Nongonierma ve FitzGerald (2014)			*		
Toplam								**2**	**3**	**2**	**0**	**0**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_776719, NP_001272516, NP_001009378). KN: kazein.
[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır.
[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin dışında Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde κ-KN türevli peptid gözlemlenmemiştir. Bu farklılığın; üretimde kullanılan süt çeşidi, sütteki plazmin ve katepsin D enzimlerinin aktivitesi, peynir mikrobiyotası ve üretim yöntemi ile ilgili farklılıklara bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Demirci (2019) Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin mikrobiyotasında farklılıkların olduğunu ve Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin Anamur, Mut ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla çok yüksek oranda *Lc. lactis* suşlarını içerdiğini bildirmiştir. *Lc. lactis* suşlarına ait proteolitik enzimlerin κ-KN'in hidrolizinde rol oynadığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Reid ve ark., 1994; Bounouala ve ark., 2017). Ancak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen κ-KN türevli peptid sayısı oldukça düşüktür. κ-KN'in diğer peynir çeşitlerinde de proteolize karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2001; Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Gómez-Ruiz ve ark., 2007; Gagnaire ve ark., 2011; Pisanu ve ark., 2015). Bu durum, diğer kazeinlere kıyasla κ-KN'in sütte az miktarda bulunmasına, peynir yapımı sırasında hidrofilik glikomakropeptidin peynir altı suyu ile kaybedilmesine bağlı olarak peynir pıhtısında kalan glikomakropeptidin sınırlı olmasına ve κ-KN'in peynirdeki proteolitik enzimlere karşı daha dirençli olmasına atfedilebilir (Gómez-Ruiz ve ark., 2004; Baum ve ark., 2013; Pisanu ve ark., 2015). Ayrıca plazmin aktivitesinin pH 5.0-5.2 aralığında peynirde sınırlı olduğu (Larsson ve ark., 2006) ve katepsin D'nin optimum aktiviteyi pH 4.0'te gösterdiği (McSweeney ve ark., 1995) dikkate alındığında, olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin pH değerinin 4.74-5.12 arasında olmasının κ-KN üzerinde etkili olabilecek plazmin ve katepsin D aktivitesini sınırlandırdığı düşünülmektedir.

Koagülant olarak kimozin kullanılan ve çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde κ-KN'in hidrofobik bölgesinden toplam 4 adet κ-KN türevli peptid tanımlanmıştır (Fontenele ve ark., 2017). Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, koagülant olarak rennet ve starter kültür olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) suşları kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra κ-KN'in hidrofobik bölgesinden 1 adet κ-KN türevli peptid tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2004).

İtalyan peynirleri olan Stracchino peynirinde κ-KN'in hidrofilik bölgesinden 1 adet ve Canestrato Pugliese peynirinde ise κ-KN'in hidrofilik bölgesinden 3 adet κ-KN türevli peptid tanımlanmıştır (Losito ve ark., 2006). Ayrıca, koagülant olarak toz buzağı

renneti ve starter olarak doğal peynir altı suyu kullanılarak çiğ inek (%70) ve koyun (%30) sütünden üretilen Canestrato Pugliese peynirlerinin 6 ay olgunlaştırılmasından sonra κ-KN'in hidrofilik bölgesinden 2 adet κ-KN türevli peptid belirlenmiştir (Rizzello ve ark., 2005). Gene aynı araştırmacılar, koagülant olarak sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak dondurularak kurutulmuş kültür kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Crescenza peynirlerinin 7 gün olgunlaştırılmasından sonra κ-KN'in hidrofilik bölgesinden 1 adet κ-KN türevli peptid belirlemişlerdir.

Çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde κ-KN'in hidrofobik ve hidrofilik bölgelerinden 4 adet κ-KN türevli peptid tespit edilmiştir (Sagardia ve ark., 2013). 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde κ-KN'in hidrofobik ve hidrofilik bölgelerinden 4 adet κ-KN türevli peptid belirlenmiştir. Koagülant olarak fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) enzim, starter kültür olarak termofilik laktik asit bakterileri (streptokok ve laktobasil) ve ikincil starter olarak propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca κ-KN'in hidrofilik bölgesinden 1 adet κ-KN türevli peptid tanımlanmıştır (Gagnaire ve ark., 2001).

Bu araştırmalardan farklı olarak, pıhtısı haşlanan bir peynir çeşidi olan Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaşma süresince (Gagnaire ve ark., 2011), koyun, keçi ve inek sütü karıştırılarak üretilen Cabrales peynirinin ve koyun sütünden üretilen Roncal peynirinin 4 ay olgunlaşma süresince (Gómez-Ruiz ve ark., 2006), inek sütünden üretilen Mahon peynirinin 2 ay olgunlaşma süresince (Gómez-Ruiz ve ark., 2006) ve sıvı buzağı renneti ile starter kültür kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen peynirlerin 9 olgunlaşma süresince (Pisanu ve ark., 2015) κ-KN türevli peptide rastlanmamıştır.

Karaman yöresinde belirlenen κ-KN türevli peptid sayısı Idiazabal (Sagardia ve ark., 2013) ve Coalho (Fontenele ve ark., 2017) peynirlerinde belirlenen κ-KN türevli peptid sayısına benzer bulunurken, Emmental (Gagnaire ve ark., 2001), Crescenza, Canestrato Pugliese (Rizzello ve ark., 2005; Losito ve ark., 2006), Stracchino (Losito ve ark., 2006) ve Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) peynirlerinde belirlenen κ-KN türevli peptid sayısından yüksek bulunmuştur. Ancak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan κ-KN türevli peptidler çeşit bakımından bu peynirlerde belirlenen κ-KN türevli peptidlerden oldukça farklılık göstermektedir. Çeşitli peynirler üzerinde daha önce gerçekleştirilen bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, farklı sayıda ve çeşitlilikte κ-KN türevli peptidlerin oluşmasının üretimde kullanılan süt türüne, sütte

bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem uygulanıp uygulanmamasına, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan κ-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında tanımlanan κ-KN türevli peptidlerin 5-7 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler arasında pentapeptidlerin baskın olarak bulunduğu görülmüştür. Sommerer ve ark. (2001) tarafından 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde 4-6, Rizzello ve ark. (2005) tarafından 6 ay olgunlaştırılan Canestrato Pugliese peynirlerinde 9-10, Sagardia ve ark. (2013) tarafından 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 8-19 ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirlerinde 7-9 amino asit uzunluğuna sahip κ-KN türevli peptidler tanımlanmıştır. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait peynirlerinin 2 ay olgunlaştırılmasından sonra Canestrato Pugliese, Idiazabal ve Coalho peynirlerine kıyasla daha kısa zincirli κ-KN türevli peptidler meydana gelmiştir. Farklı peynirlerin κ-KN türevli peptid uzunluğunda gözlemlenen değişimler proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Biyoaktif potansiyele sahip peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden oluştuğu bildirilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007). Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen kısa zincirli κ-KN türevli peptidlerden 2 tanesinin ACE inhibitörü, antioksidan ve DPP-4 inhibitörü olmak üzere 3 farklı biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen IPIQY, κ-KN (47-51), peptidinin 35.2 μM IC_{50} değeri ile DPP-4 inhibisyonu sağladığı ve 4.58 DPPH EC_{50} değeri ile antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2014). Yani bu peptid multifonksiyonel bir peptiddir. Gene, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen LPYPY, κ-KN (77-81), peptidinin 108.3 μM IC_{50} değeri ile DPP-4 inhibisyonu sağladığı ve >5 mM DPPH EC_{50} değeri ile antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2014). Ayrıca, bu peptidin 28 μM IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2007). Dolayısıyla, LPYPY peptidi de çok fonksiyonlu bir peptiddir.

Fontenele ve ark. (2017) kazeinlerin özellikle κ-kazeinin sıkı ve gevşek alanlara sahip olduğunu ve bu durumun proteolitik enzimlerin erişimini etkilediğini öne sürmüşlerdir. Bu durumla ilgili olarak, Farrell ve ark. (2002) κ-kazeinin 14-64 amino

asitleri arasındaki bölgenin sıkıyı bir yapıya sahip olduğunu ve 105-169 amino asitleri arasındaki geniş bölgenin ise gevşek yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gevşek bölgeden κ-KN (139-145), peptidinin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, sıkı bölgeden de bir peptidin, κ-KN (47-51), meydana geldiği belirlenmiştir. Diğer peptidler ise bu bölgelerin dışındaki hidrofobik bölgeden (*para*-κ-kazein) meydana gelmiştir. Dolayısıyla, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN üzerinde çok çeşitli proteolitik enzim aktivitesi görülmüştür.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde hidrofilik ve esnek bölgeden tanımlanan κ-KN (139-145), EIPAINT, peptidinin öncesinde veya sonrasında plazmin ve katepsin D enziminin etkili olduğu lizin, arjinin, lösin ve tirozin amino asitlerine ait bağlar bulunmamaktadır (Larsen ve ark., 1996; Bastian ve ark., 1997). Dolayısıyla, bu peptid mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir. Hidrofobik ve sıkı bölgeden meydana gelen κ-KN (47-51), IPIQY, peptidi ise katepsin D enziminin aktivitesi veya mikrobiyal enzimlerin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir. IPIQY peptidinin sonunda tirozin (Y) amino asidinin bulunması ve κ-KN üzerinde IPIQY peptidinden hemen önce de tirozin (Y) amino asidinin yer alması bu amino asit bağlarında etkili katepsin D enzimi aktivitesini düşündürmektedir (Larsen ve ark., 1996). Bununla birlikte, Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis* suşlarının aktivitesi ile koyun sütünde YIPIQY peptidinin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Reid ve ark. (1994) *Lc. lactis* suşlarına ait P_I- ve P_{III}-tipi proteinazların IPIQY peptidini içeren KYIPIQYVL peptidini meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Chang ve ark. (2014) ise *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların IPIQY dizilimlerini içeren AKYIPIQYV, AKYIPIQYVLS, AKYIPIQYVLSR ve YIPIQYVLSR peptidlerini meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. *Lc. lactis* ve *S. thermophilus* suşlarının zaten Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde bulunduğu Demirci (2019) tarafından belirlenmiştir. Dolayısıyla, IPIQY peptidinin oluşumunda bu suşlara ait enzimler de görev almış olabilir. Buna bağlı olarak, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN'in sıkı bölgesinde aktivite gösterebilecek çok sayıda potansiyel proteolitik enzimin olduğu düşünülmektedir ve sıkı bölgedeki parçalanma bu bölgede etkili olabilen bu enzimlerin varlığı ile açıklanabilir.

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN'in yine hidrofobik bölgesinden belirlenen κ-KN (77-81), LPYPY, peptidi de katepsin D enziminin aktivitesi veya mikrobiyal enzimlerin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir. LPYPY peptidinin C terminalinde tirozin (Y) amino asidinin bulunması ve κ-KN üzerinde LPYPY peptidinden

hemen sonra da tirozin (Y) amino asidinin yer alması bu amino asit bağlarında etkili katepsin D enzimi aktivitesini akla getirmektedir (Larsen ve ark., 1996). Ayrıca, Chang ve ark. (2014) ise *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların LPYPY dizilimlerini içeren INNQFLPYPY, NNQFLPYPYY ve QFLPYPYYAKPAA peptidlerini meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* suşuna ait hücre dışı proteinazların koyun sütünde FLPYPY peptidini oluşturduğunu ve *Lc. lactis* suşuna ait hücre dışı proteinazların ise inek sütünde LPYPYY peptidinin meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, LPYPY peptidinin oluşumunda bu suşlara ait enzimler de görev almış olabilir. Demirci (2019) tarafından *Lc. lactis, L. brevis* ve *S. thermophilus* suşlarının Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde bulunduğu bildirilmiştir.

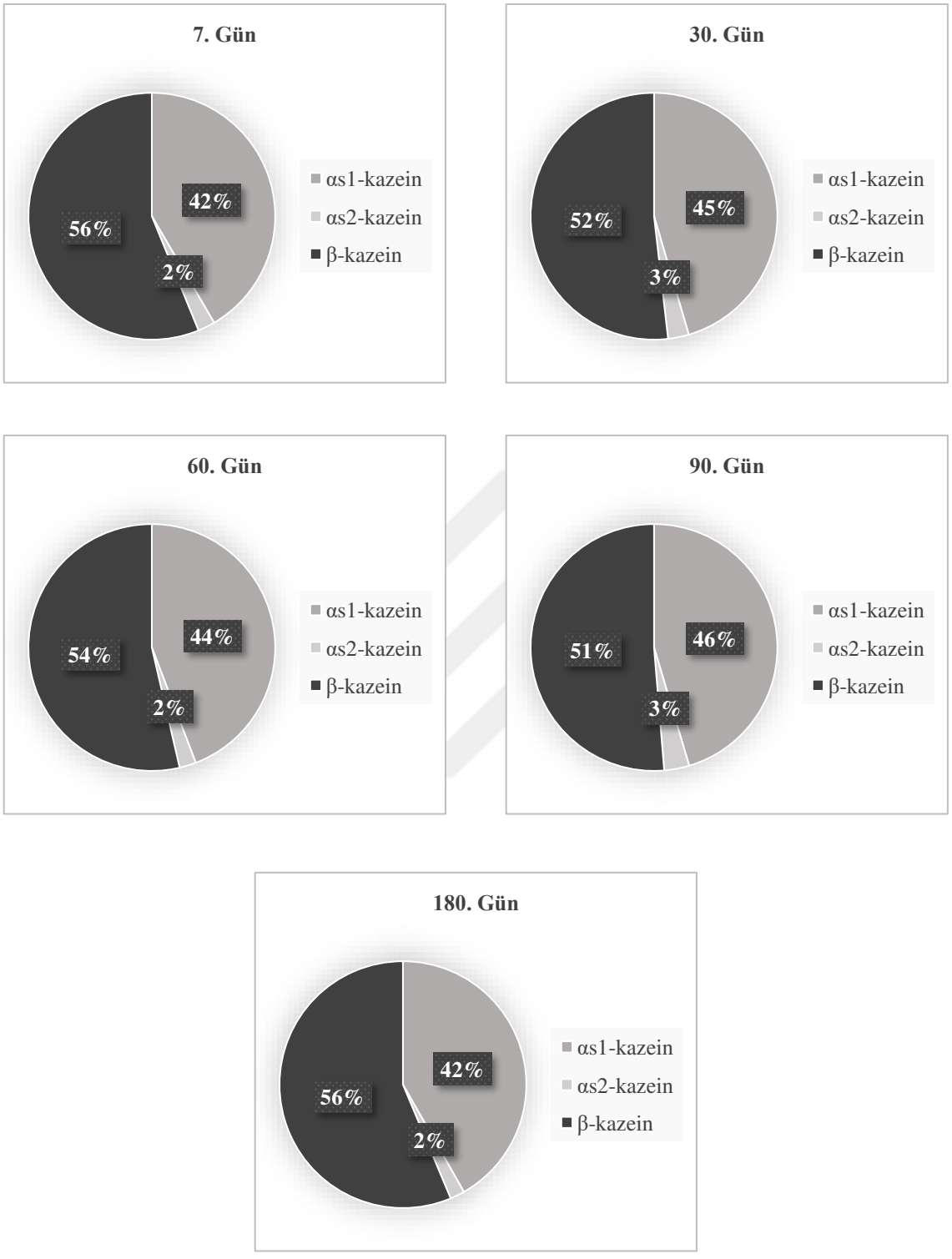
Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN'in hidrofobik bölgesinden meydana gelen bir diğer peptid olan κ-KN (98-102), QVLPN, peptidinin öncesinde veya sonrasında plazmin ve katepsin D enziminin etkili olduğu lizin, arjinin, lösin ve tirozin amino asitlerine ait bağların (Larsen ve ark., 1996; Bastian ve ark., 1997) bulunmaması nedeniyle, bu peptidinin mikrobiyal proteolitik enzimlerin vasıtasıyla meydana geldiği düşünülmektedir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 1. ayına kadar belirlenen QVLPN peptidine yakın olarak çiğ koyun sütünden üretilen Idiazabal peynirlerinin 4 ay olgunlaştırılmasından sonra QVLPNAVP peptidi tespit edilmiştir (Sagardia ve ark., 2013).

Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar κ-KN türevli peptidler gözlemlenmiş olup, en yüksek κ-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin 30. gününde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 60. gününden sonra ise bu peptidlerin muhtemelen ileri düzeyde parçalanmasından ve proteolitik enzimlere oldukça dirençli olan κ-KN'den yeni peptidlerin meydana gelmemesinden dolayı bu süreçte κ-KN türevli peptidler tespit edilmemiş olabilir. Olgunlaşma süresinin 7. gününde IPIQY ve QVLPN peptidleri belirlenmiştir. IPIQY peptidinin olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar bulunduğu ve QVLPN peptidinin olgunlaşma süresinin 30. gününe kadar bulunduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin 30. gününde ise IPIQY ve QVLPN peptidlerine ek olarak EIPANT peptidinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak, EIPANT peptidine yalnızca olgunlaşma süresinin 30. gününde rastlanmıştır. Olgunlaşma süresinin 60. gününde yeni meydana gelen LPYPY peptidi ile IPIQY peptidinin bulunduğu belirlenmiştir ve bu peptidlerin ilerleyen olgunlaşma günlerinde ileri derecede

hidroliz olduğu gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN türevli peptidlerin farklı olgunlaşma günlerinde ileri derecede hidrolize olması, bu peptidlere spesifik proteolitik enzim aktivitesinin ilgili olgunlaşma gününde yoğun bir şekilde gerçekleşmesinden kaynaklanmış olabilir. Taivosalo ve ark. (2018) mikrobiyal rennet ve starter kültürler (mezofilik ve termofilik) kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Old Saare peynirlerinde κ-KN türevli peptidlerin sayısının gerçekleşen ileri derecede proteolize bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacı, olgunlaşma süresinin başlarında hidrofilik glikomakropeptidden meydana gelen κ-KN türevli peptidlerin daha yüksek sayıda bulunduğunu ve 8 aylık olgunlaşma süresinin sonlarına doğru *para*-κ-KN'den meydana gelen peptidlerin daha yüksek sayıda bulunduğunu tespit etmiştir.

4.3.4. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca belirlenen peptid dinamiği ve meydana gelen peptidlerin biyoaktiviteleri

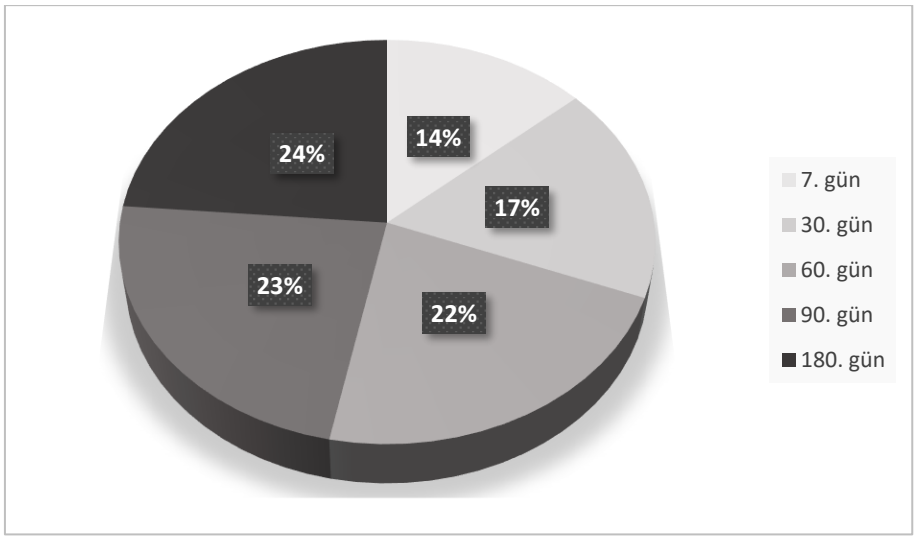
Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresince peptid dinamiğinde meydana gelen değişimi gözlemlemek amacıyla Şekil 4.21. düzenlenmiştir. Olgunlaşma süresine bağlı olarak α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazein türevli peptidlerin meydana gelme oranları değerlendirilmiştir. Anamur ve Mut yörelerine benzer şekilde Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde κ-kazein türevli peptidler gözlemlenmemiştir. κ-kazeinin koagülant etkisiyle peynirde *para*-κ-kazein olarak kaldığı bilinmektedir. Dolayısıyla, κ-kazein türevli peptidlerin gözlemlenmemesi, *para*-κ-kazeinin proteolitik enzimlere karşı olan direncinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Thorn ve ark., 2014). Olgunlaşma süresince Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-kazein türevli olduğu görülmüştür ve bunu sırasıyla α_{s1}- ve α_{s2}-kazein türevli peptidler izlemiştir. Benzer şekilde, Gagnaire ve ark. (2011), Sadat-Mekmene ve ark. (2013) ve Fontenele ve ark. (2017) sırasıyla Ragusano peynirinin, İsviçre tipi peynirlerinin ve Coalho peynirinin peptid dinamiklerinde β-kazeinlerin en büyük paya sahip olduğunu bildirmişlerdir. α_{s2}-kazein türevli peptidlerin az oranda belirlenmesi ve olgunlaşma süresince α_{s2}-kazein türevli peptid oranın sabit kalması tulum peynirlerinin olgunlaşması sırasında artan asitlik değerlerine bağlı olarak plazmin aktivitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir (Larsson ve ark., 2006). Olgunlaşma süresi boyunca peptid dinamiğinde α_{s1}- ve β-kazeinlerin daha etkin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinden peptid dinamiğinin olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

İlginç bir şekilde, Anamur, Mut ve Karaman yörelerinin aksine Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar α_{s1}-kazein türevli peptid oranı %42'den %46'ya artarken, β-kazein türevli peptid oranı ise %56'dan %51'e düşmüştür. Ancak, olgunlaşma süresinin sonunda β-kazein türevli peptid oranının arttığı, α_{s1}-kazein türevli peptid oranının ise azaldığı tespit edilmiştir. Yöreler arasındaki bu farklılık, en yüksek α_{s1}-kazein türevli peptid sayısının Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde görülmesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla bu süreçte Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde bulunan mikrobiyota ve buna bağlı olarak mikrobiyal enzimlerin çeşitliliği peptid dinamiğinde yöresel farklılıklara neden olmaktadır. Demirci (2019) Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin çok daha çeşitli mikrobiyotaya sahip olduğunu bildirmiştir. İlgili araştırmacı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Bacillus* türlerine ait suşlar tespit etmiştir ve bunlar arasından *Bacillus luciferensis*, *Leu. mesenteroides*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. coryniformis*, *S. macedonicus*, *S. infantarius* suşlarını yalnızca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlemiştir. Dolayısıyla bu farklı mikrobiyotanın α_{s1}-kazein üzerinde etkili olmuştur. Kliche ve ark. (2017) *L. helveticus*'a ait proteolitik enzimlerin yüksek oranda α_{s1}-kazeinin hidrolizine neden olduğu, β-kazein üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Solieri ve ark. (2018) *L. rhamnosus*'a ait proteolitik enzimlerin ilk olarak β-kazein üzerinde ve hemen sonra α_{s1}-kazein üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirleri için fonksiyonel peptid oranının olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimini gözlemlemek amacıyla Şekil 4.22. düzenlenmiştir. Bu biyoaktif peptidlerin, meydana gelen peptid çeşidine bağlı olarak ACE inhibitörü, antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinojenik, GLP-1 artırıcı, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, beyin fonksiyonunu artırıcı, kolesterol düzenleyici, antifungal, antidiyabetik, obezite önleyici, antienflamatuar, cilt yenileyici, antiamnezik, opioid ve katepsin B inhibitörü olmak üzere toplam 17 farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En fazla biyolojik aktivite Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen fonksiyonel peptid sayısının olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Olgunlaşma süresinin fonksiyonel peptid sayısı üzerinde önemli etkiye sahip olduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak biyoaktif peptid oranında artış belirlenmiştir. Biyoaktif özellik gösteren peptidlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β- kazein türevli olduğu belirlenmiştir ve belirlenen fonksiyonel aktivitenin yarısından fazlasının β-kazein türevli peptidlerden geldiği tespit edilmiştir. Bu durum, β-kazein türevli peptidlerin daha yüksek sayıda meydana gelmesinden kaynaklanmıştır. ACE inhibitörü özellik gösteren peptidlerin sayısı en yüksek bulunurken, bunu antimikrobiyal ve antioksidan peptidler izlemiştir. Belirlenen peptidlerin biyolojik aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin tansiyon düşürücü ve hatta antioksidan kaynağı bir gıda olduğu görülmektedir. ACE inhibitörü peptidlerin peynirde yüksek sayıda olduğu birçok araştırmacı tarafından da belirtilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006; Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin Ragusano peynirinden (Gagnaire ve ark., 2011) ve Coalho peynirinden (Fontenele ve ark., 2017) daha fazla çeşitlilikte biyoaktif peptid içerdiği belirlenmiştir. Biyoaktif peptid çeşitliliğinde gözlemlenen bu farklıların, peynirlerde değişik proteolitik enzimlerin bulunmasından ve bu enzimlerin farklı aktiviteler göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.4.1. α_{s1}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.26.'da sunulmaktadır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 88 çeşit α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Diğer yörelere kıyasla, en fazla α_{s1}-KN türevli peptid Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. α_{s1}-KN türevli peptid sayısındaki bu farklılığın tulum peyniri üretiminde kullanılan süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi, koagülant miktarı, aktif peynir mikrobiyotası ve üretim metodu ile ilgili farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

α_{s1}-KN'in peynirde ilk olarak kalan koagülant aktivitesi ile parçalandığını bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1997). α_{s1}-KN ayrıca olgunlaşma sırasında da peynirde kalan kimozin ile ileri derecede hidrolize olmaktadır ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde mikrobiyal proteinazlar veya peptidazlar ve daha az olarak sütün doğal enzimleri olan plazmin ve katepsin D ile hidrolize olabilmektedir (Ardö ve ark., 2017). Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin aktivitesi sonucunda sığıra özgü α_{s1}-KN türevli RPKHPIK, RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLR, FALPQYLK ve FFVAPFPEVFGKEK peptidlerinin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer peptidler, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Ayrıca, Dalsgaard ve ark. (2008) plazmin aktivitesi ile genellikle uzun α_{s1}-KN türevli peptidlerin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Hurley ve ark. (2000) α_{s1}-KN üzerinde katepsin D aktivitesinin kimozin ile benzer olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kazeinlerin parçalanmasında rol alan mikrobiyal proteolitik enzimler ise proteinazlardan ve peptidazlardan oluşmaktadır. Peynirde bulunan kazeinler mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere parçalanırken, oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede hidrolize olduğu bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017).

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (77 adet) α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 10 peptidin α_{s1}-KN'in orta bölgesinden ve 1 peptidin α_{s1}-KN'in C terminal bölgesinden oluştuğu tespit edilmiştir. Yapılan çoğu çalışmada da peynirde tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidlerin N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir (Singh ve ark., 1997; Fernández ve ark., 1998; Sagardia ve ark., 2013; Fontenele ve ark., 2017). Swaisgood (2003) α_{s1}-KN'nin 3 farklı hidrofobik bölgeye sahip

olduğunu ve bu bölgelerin 1-44, 90-113 ve 132-199 fraksiyonlarından meydana geldiğini bildirmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'in hidrofobik bölgelerinden daha fazla parçalandığı görülmüştür. Bu durum hidrofobik bölgenin proteolitik enzimlere karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Hidrofobik bölgeler olan α_{s1}-KN (16-44) bölgesinden 40 peptid, α_{s1}-KN (100-113) bölgesinden 8 peptid ve α_{s1}-KN (146-157) bölgesinden 1 peptid olmak üzere toplam 49 peptid tanımlanmıştır. Benzer şekilde, Miclo ve ark. (2012) tarafından α_{s1}-KN'in 1-40 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin ve Chang ve ark. (2013) tarafından α_{s1}-KN'in 8-35 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte hidrofilik bölgeler olan α_{s1}-KN (50-55) bölgesinden 1 peptid ve α_{s1}-KN (119-129) bölgesinden 3 peptid olmak üzere toplam 9 peptid tanımlanmıştır. Ayrıca, 35 peptidin α_{s1}-KN (36-55) bölgesinde bulunan hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri içeren peptidlerden meydana geldiği belirlenmiştir. Hidrofobik bölgeyi takiben hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri içeren peptidlerin de yoğun olarak bulunduğu gözlemlenmiştir.

Keçi sütünden üretilen ve 3 hafta olgunlaştırılan peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 17 peptid (Sommerer ve ark., 2001), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 50 peptid (Gómez-Ruiz ve ark., 2007), 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde α_{s1}-KN türevli 34 peptid (Gagnaire ve ark., 2011) ve çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerin 9 ay olgunlaştırılmasından sonra 62 adet α_{s1}-KN türevli peptid (Pisanu ve ark., 2015) tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda olgunlaşma süresi ile peptid sayısı arasında bir korelasyon görülmektedir. Ancak, bu çalışmalara kıyasla 6 ay olgunlaştırılan Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde çok daha fazla α_{s1}-KN türevli peptidin oluştuğu ilgi çekmektedir. Bu farklılığın üretimde kullanılan süt türü ve ısıl işlem gibi üretim metodundaki farklılıklardan ve peynirlerin mikrobiyotasındaki farklılıklardan meydana geldiği düşünülmektedir. Çeşitli İtalyan peynirlerinin üretiminde farklı süt çeşitlerinin kullanılması sonucunda suda çözünebilir ekstraktlarda farklı peptidlerin meydana geldiği gözlemlemiştir (Losito ve ark., 2006). Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) ve Pisanu ve ark. (2015) çiğ sütten üretilen peynirlerde pastörize süt kullanılarak üretilen peynirlere kıyasla daha fazla peptid bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidlerin 5-23 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyoaktif peptidlerin de 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden meydana geldiği göz önünde bulundurulduğunda,

tanımlanan bu peptidlerin biyoaktif özellik gösterme potansiyeli çok yüksektir (Hartmann ve Meisel, 2007). Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha uzun α_{s1}-KN türevli peptidler belirlenmiştir. Diğer yörelerden farklı olarak, 23 amino asitten oluşan bir antimikrobiyal peptid olan RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF peptidi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Bu peptid, israsidin peptidi olarak da bilinmektedir. Bununla birlikte, Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde bu peptidin ileri parçalanma ürünleri görülmüştür. Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılıklar, proteolitik aktivitenin çeşitliliğini yansıtmaktadır. Coalho peynirlerinde 7-23 amino asit uzunluğuna sahip α_{s1}-KN türevli peptidlerin olduğu (Fontenele ve ark., 2017) ve 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 8-23 amino asit uzunluğuna sahip α_{s1}-KN türevli peptidlerin oluştuğu (Gagnaire ve ark., 2011) tespit edilmiştir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptidler arasında hekzapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu pentapeptidlerin ve heptapeptidlerin takip ettiği görülmüştür. Ancak, diğer yörelere kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 8-14 arasında amino asit içeren peptidlerin daha fazla sayıda bulunduğu belirlenmiştir. Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde 10≤ amino asit içeren α_{s1}-KN türevli peptid sayısı sırasıyla 7, 10, 7 ve 36 olarak tespit edilmiştir. Diğer yörelere kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin daha yüksek sayıda olmasının özellikle bu uzun peptidlerden kaynaklandığı görülmektedir. Bu durum, farklı yörelere ait peynirlerde mikrobiyotaya bağlı olarak farklı çeşitlilikte proteolitik enzimlerin bulunduğunu ve bu enzimlerin aktivitelerinin farklı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, Demirci (2019) tarafından Anamur, Mut ve Karaman yörelerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde mikrobiyal çeşitliliğin daha fazla olduğunun bildirilmesi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla α_{s1}-KN türevli peptid bulunması ile tutarlılık göstermektedir. Ayrıca, olgunlaşma süresinin başında ve sonunda pH değerinin kısmen Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha yüksek olması bazı proteolitik enzimlerinin aktivitesini de desteklemiş olabilir.

Çizelge 4.26. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	2.477	1139.6676	α_{s1}-KN (16-24)	Bovine	RPKHPIKHQ	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
2	2.479	1196.6911	α_{s1}-KN (16-25)	Bovine	RPKHPIKHQG	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*		
3	2.555	983.5665	α_{s1}-KN (17-24)	Bovine	PKHPIKHQ	Antibakteriyal	Fialho ve ark. (2018)			*	*	*
4	3.544	1241.6523	α_{s1}-KN (19-29)	Ovine	HPIKHQGLSPE	-	-			*		
5	4.157	643.3657	α_{s1}-KN (33-37)	Bovine	ENLLR	-	-	*	*	*	*	
6	8.575	1534.8751	α_{s1}-KN (16-28)	Bovine	RPKHPIKHQGLPQ	ACE inhibitörü	Saito ve ark. (2000)				*	
7	8.652	1622.8947	α_{s1}-KN (16-29)	Ovine	RPKHPIKHQGLSPE	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	
8	9.336	1378.7780	α_{s1}-KN (17-28)	Bovine	PKHPIKHQGLPQ	-	-			*	*	*
9	9.413	1663.9345	α_{s1}-KN (16-29)	Bovine	RPKHPIKHQGLPQE	Antibakteriyal	Fialho ve ark. (2018)			*	*	
10	10.173	1507.8292	α_{s1}-KN (17-29)	Bovine	PKHPIKHQGLPQE	-	-			*	*	
11	13.529	757.4096	α_{s1}-KN (32-37)	Bovine	NENLLR	-	-					*
12	17.793	870.4935	α_{s1}-KN (31-37)	Bovine	LNENLLR	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017b)	*	*	*	*	*
13	18.100	1034.5052	α_{s1}-KN (100-108)	Bovine	DVPSERYLG	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)					*
14	18.479	730.3502	α_{s1}-KN (50-55)	Caprine	ENINEL	-	-					*
15	18.556	2346.3012	α_{s1}-KN (16-35)	Bovine	RPKHPIKHQGLPQEVLNENL	-	-				*	
16	18.710	559.2629	α_{s1}-KN (41-45)	Bovine	APFPE	DPP-4 inhibitörü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, ACE inhibitörü	Boots (2012), Boots (2013), Abdel-Hamid ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
17	18.786	601.3067	α_{s1}-KN (31-35)	Bovine	LNENL	-	-					*
18	19.015	700.3746	α_{s1}-KN (30-35)	Bovine	VLNENL	ACE inhibitörü	Benavente ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
19	19.468	2190.2002	α_{s1}-KN (17-35)	Bovine	PKHPIKHQGLPQEVLNENL	-	-			*		
20	19.546	2615.4867	α_{s1}-KN (16-37)	Ovine	RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLR	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)		*	*	*	
21	19.773	569.3188	α_{s1}-KN (119-123)	Caprine	NVPQL	-	-				*	*
22	19.929	977.4814	α_{s1}-KN (100-107)	Bovine	DVPSERYL	-	-	*	*	*	*	*
23	20.081	721.3625	α_{s1}-KN (107-112)	Bovine	LGYLEQ	-	-			*	*	*

24	20.231	969.5620	α_{s1}-KN (30-37)	Bovine	VLNENLLR	Antibakteriyal	Hayes ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
25	20.841	601.3061	α_{s1}-KN (32-36)	Bovine	NENLL	Antioksidan	Bezerra ve ark. (2013)			*	*	*
26	20.917	658.3319	α_{s1}-KN (40-45)	Bovine	VAPFPE	-	-	*	*	*	*	*
27	21.681	531.3045	α_{s1}-KN (38-42)	Caprine	FVVAP	-	-					*
28	21.757	1169.5716	α_{s1}-KN (104-112)	Bovine	ERYLGYLEQ	-	-		*	*	*	*
29	21.908	1384.7004	α_{s1}-KN (146-157)	Bovine	QKEPMIGVNQEL	-	-					*
30	21.984	1098.6015	α_{s1}-KN (25-32)	Bovine	GLPQEVLN	-	-			*	*	*
31	22.139	664.3412	α_{s1}-KN (109-113)	Bovine	YLEQL	-	-	*	*	*	*	*
32	22.517	529.2896	α_{s1}-KN (40-44)	Bovine	VAPFP	-	-	*	*	*	*	*
33	22.669	697.3988	α_{s1}-KN (26-31)	Bovine	LPQEVL	-	-			*	*	*
34	22.822	1135.6599	α_{s1}-KN (120-129)	Bovine	KVPQLEIVPN	-	-			*	*	*
35	22.978	757.4056	α_{s1}-KN (39-45)	Caprine	VVAPFPE	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2002)	*	*	*	*	*
36	23.355	1282.6885	α_{s1}-KN (27-37)	Ovine	SPEVLNENLLR	-	-	*				
37	23.506	1346.7225	α_{s1}-KN (40-51)	Bovine	VAPFPEVFGKEK	-	**-**			*	*	*
38	23.582	714.3934	α_{s1}-KN (31-36)	Bovine	LNENLL	-	-	*	*	*	*	*
39	23.584	2721.5352	α_{s1}-KN (16-38)	Ovine	RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF	Antibakteriyal, immünomodülatör	Lahov ve Regelson (1996); Hayes ve ark. (2007a)	*	*	*	*	
40	23.893	531.3062	α_{s1}-KN (39-43)	Caprine	VVAPF	-	-	*	*	*	*	*
41	24.191	1530.8187	α_{s1}-KN (39-51)	Caprine	VVAPFPEVFRKEN	-	-	*	*	*		
42	24.193	713.3946	α_{s1}-KN (25-31)	Ovine	GLSPEVL	-	**-**	*	*	*	*	*
43	24.199	721.3643	α_{s1}-KN (108-113)	Bovine	GYLEQL	-	-		*	*	*	*
44	24.346	658.3355	α_{s1}-KN (41-46)	Bovine	APFPEV	-	**-**				*	*
45	24.351	1287.7372	α_{s1}-KN (39-49)	Caprine	VVAPFPEVFRK	-	-	*	*	*	*	*
46	24.422	754.4233	α_{s1}-KN (25-31)	Bovine	GLPQEVL	DPP-4 inhibitörü, antifungal	Boots (2012), McNair ve ark. (2018)		*	*	*	*
47	24.498	661.3903	α_{s1}-KN (34-38)	Bovine	NLLRF	ACE inhibitörü ve antioksidan, antikarsinojenik	Hernández-Ledesma ve ark. (2005) Sah ve ark. (2015)	*	*	*	*	*
48	24.649	1416.7768	α_{s1}-KN (39-50)	Caprine	VVAPFPEVFRKE	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*		
49	24.650	628.3572	α_{s1}-KN (39-44)	Caprine	VVAPFP	-	**-**	*	*	*	*	*
50	24.803	1298.7235	α_{s1}-KN (119-129)	Bovine	YKVPQLEIVPN	-	**-**			*	*	*
51	24.955	990.5168	α_{s1}-KN (41-49)	Bovine	APFPEVFGK	-	**-**				*	*
52	25.031	1886.9983	α_{s1}-KN (39-54)	Caprine	VVAPFPEVFRKENINE	-	**-**	*				

53	25.038	813.4628	α_{s1}-KN (30-36)	Bovine	VLNENLL	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
54	25.108	904.4765	α_{s1}-KN (32-38)	Bovine	NENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
55	25.190	961.5067	α_{s1}-KN (41-48)	Caprine	APFPEVFR	-	-				*	*
56	25.260	790.4329	α_{s1}-KN (33-38)	Bovine	ENLLRF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
57	26.105	757.3992	α_{s1}-KN (40-46)	Bovine	VAPFPEV	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
58	26.327	805.4002	α_{s1}-KN (39-45)	Bovine	FVAPFPE	ACE inhibitörü, antioksidan	Hernández-Ledesma ve ark. (2005)		*	*	*	*
59	26.403	1089.5872	α_{s1}-KN (40-49)	Bovine	VAPFPEVFGK	DPP-4 inhibitörü, ACE inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017b); Elkhtab ve ark. (2017)		*	*	*	*
60	26.632	1060.5708	α_{s1}-KN (40-48)	Caprine	VAPFPEVFR	-	-	*	*	*	*	
61	26.782	1017.5614	α_{s1}-KN (31-38)	Bovine	LNENLLRF	GLP-1 sekresyonunu artırıcı	O'Halloran ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
62	26.784	1493.7960	α_{s1}-KN (39-51)	Bovine	FVAPFPEVFGKEK	Antibakteriyal	Rana ve ark. (2018)		*	*	*	*
63	26.861	1835.9482	α_{s1}-KN (39-54)	Bovine	FVAPFPEVFGKEKVNE	ACE inhibitörü	del Mar Contreras ve ark. (2009)				*	
64	27.089	1706.9054	α_{s1}-KN (39-53)	Bovine	FVAPFPEVFGKEKVN	-	-					*
65	27.165	694.3309	α_{s1}-KN (43-48)	Bovine	FPEVFG	-	-		*	*	*	*
66	27.241	834.4503	α_{s1}-KN (107-113)	Bovine	LGYLEQL	-	-		*	*	*	*
67	27.472	2000.0788	α_{s1}-KN (39-55)	Caprine	VVAPFPEVFRKENINEL	-	-	*	*			
68	27.479	856.4697	α_{s1}-KN (39-46)	Caprine	VVAPFPEV	Antibakteriyal	Rizzello ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
69	27.620	1434.8034	α_{s1}-KN (38-49)	Caprine	FVVAPFPEVFRK	-	-			*		
70	27.698	1592.8602	α_{s1}-KN (39-52)	Bovine	FVAPFPEVFGKEKV	Antienflamatuar, antidiyabetik (tip II), obezite önleyici	Kruzel (2011)				*	*
71	27.774	1116.6291	α_{s1}-KN (30-38)	Bovine	VLNENLLRF	ACE inhibitörü	Georgalaki ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
72	27.927	1159.6387	α_{s1}-KN (39-48)	Caprine	VVAPFPEVFR	-	-	*	*	*	*	*
73	28.242	904.4697	α_{s1}-KN (38-45)	Caprine	FVVAPFPE	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
74	28.308	676.3578	α_{s1}-KN (39-44)	Bovine	FVAPFP	Cilt yenileyici	Gorouhi ve Maibach (2009)		*	*	*	*
75	28.534	28.534	α_{s1}-KN (36-45)	Caprine	LRFVVAPFPE	-	-		*			
76	28.536	637.3103	α_{s1}-KN (43-47)	Bovine	FPEVF	-	-				*	*

77	28.537	1245.6690	α_{s1}-KN (29-38)	Bovine	EVLNENLLRF	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)					
78	28.688	1949.0333	α_{s1}-KN (39-55)	Bovine	FVAPFPEVFGKEKVNEL	-	-			*	*	*
79	29.222	862.4194	α_{s1}-KN (41-48)	Bovine	APFPEVFG	-	-				*	*
80	29.603	1236.6545	α_{s1}-KN (39-49)	Bovine	FVAPFPEVFGK	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)		*	*	*	*
81	29.603	1365.7005	α_{s1}-KN (39-50)	Bovine	FVAPFPEVFGKE	Antioksidan	Rana ve ark. (2018)				*	*
82	29.997	775.4256	α_{s1}-KN (38-44)	Caprine	FVVAPFP	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
83	30.136	805.4011	α_{s1}-KN (41-47)	Bovine	APFPEVF	DPP-4 inhibitörü	Boots (2012)		*	*	*	*
84	30.365	1680.8404	α_{s1}-KN (100-113)	Bovine	DVPSERYLGYLEQL	-	-					*
85	30.593	961.4922	α_{s1}-KN (40-48)	Bovine	VAPFPEVFG	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)				*	*
86	31.201	1306.7088	α_{s1}-KN (38-48)	Caprine	FVVAPFPEVFR	-	-		*			
87	32.422	1003.5380	α_{s1}-KN (39-47)	Caprine	VVAPFPEVF	ACE inhibitörü	Espejo-Carpio ve ark. (2013)	*	*	*	*	*
88	33.946	1108.5562	α_{s1}-KN (39-48)	Bovine	FVAPFPEVFG	ACE inhibitörü	Robert ve ark. (2004)				*	*
Toplam								**37**	**49**	**60**	**69**	**66**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_851372, NP_001272624, NP_001009795). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, GLP-1 sekresyonunu artırıcı: glukagon benzeri peptid-1 sekresyonunu artırarak insülin salımını artırmakta ve iştahı azaltmaktadır, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, Antienflamatuar: iltihap oluşumunu önleyici.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Peynirlerde α_{s1}-KN'in proteolizi sonucunda genellikle israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana geldiği birçok çalışmada bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009; Pisanu ve ark., 2015; Georgalaki ve ark., 2017). İsrasidin 23 amino asit uzunluğuna sahip ve α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinde bulunan bir peptiddir (Pisanu ve ark., 2015). Bu antimikrobiyal peptidinin dizilimi, bazı amino asitlerde gözlemlenen farklılıklardan dolayı süt çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Sforza ve ark., 2011). İsrasidin, α_{s1}-KN'in kimozin ile parçalanması sonucunda meydana gelmektedir (Lahov ve Regelson, 1996). Buna ek olarak, ilerleyen olgunlaşma günlerinde kalan kimozin aktivitesi ve mikrobiyal proteolitik enzimler ile israsidin ileri derecede hidrolize uğramaktadır. Hafeez ve ark. (2015) *S. thermophilus* LMD-9'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların, hücre dışı aminopeptidazların ve X-prolil dipeptidil peptidazların israsidinin hidrolizine neden olarak NENLLRF, ENLLRF, RF, RPKHPIKHQGLPQEVLNENLL, RPKHPIKHQGLPQEVL, RPKHPIKHQGLPQ, RPKHPIKHQGLPQEVLN, RPKHPIKHQ, RPKHPIKH ve RPKHPIK peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar bazı *S. thermophilus* suşlarının israsidin üzerinde aminopeptidaz ve X-prolil dipeptidil peptidaz aktivitesinin yanı sıra hücre dışı karboksipeptidaz ve peptidil dipeptidaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Exterkate ve ark. (1991) *Lc. lactis* subsp. *cremoris*'e ait hücre duvarı ilişkili P_I ve P_{III} proteinazlarının israsidini sırasıyla N terminal ve C terminal bölgesinden hidrolize ettiklerini belirlemiştir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde toplam 33 peptidin israsidin türevli olduğu gözlemlenmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen israsidin türevli peptid sayısı Anamur (18), Mut (28) ve Karaman (21) yöresine ait tulum peynirlerde belirlenen israsidin türevli peptid sayısından yüksek bulunmuştur. Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılığın, tulum peyniri üretiminde kullanılan koagülant çeşidinin ve miktarının farklılığından ve peynirlerde bulunan mikrobiyotanın çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'lerden 13 tanesinin, α_{s1}-KN (16-24), α_{s1}-KN (16-25), α_{s1}-KN (16-28), α_{s1}-KN (16-29/ovine), α_{s1}-KN (16-29/bovine), α_{s1}-KN (16-35), α_{s1}-KN (16-37), α_{s1}-KN (16-38), α_{s1}-KN (17-24), α_{s1}-KN (17-28), α_{s1}-KN (17-29), α_{s1}-KN (17-35) ve α_{s1}-KN (19-29), israsidinin N terminalinden bölgesinden meydana geldiği belirlenmiştir. İsrasidinin orta bölgesinden 4 peptid, α_{s1}-KN (25-31/ovine), α_{s1}-KN (25-31/bovine), α_{s1}-KN (25-32) ve α_{s1}-KN (26-31), tanımlanmıştır. Çizelge 4.26'da meydana gelen peptidlerin süt kaynağı daha detaylı olarak sağlanmıştır, burada peptidlerin farklılığını belirtmek amacıyla inek veya koyun

sütüne ait olduğu belirtilmiştir. İsrasidinin C terminalinden bölgesinden ise 16 peptid, α_{s1}-KN (27-37), α_{s1}-KN (29-38), α_{s1}-KN (30-35), α_{s1}-KN (30-36), α_{s1}-KN (30-37), α_{s1}-KN (30-38), α_{s1}-KN (31-35), α_{s1}-KN (31-36), α_{s1}-KN (31-37), α_{s1}-KN (31-38), α_{s1}-KN (32-36), α_{s1}-KN (32-37), α_{s1}-KN (32-38), α_{s1}-KN (33-37), α_{s1}-KN (33-38) ve α_{s1}-KN (34-38), tanımlanmıştır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde israsidin türevli peptidler incelendiğinde, çoğunlukla karboksipeptidaz aktivitesine bağlı olarak C terminal bölgesinden parçalanmalar görülmekle birlikte bunu N terminal bölgesinde etkili aminopeptidaz aktivitesi takip etmiştir. Diğer yörelere ait tulum peynirlerinde de olduğu gibi, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde diğer proteolitik enzimlere kıyasla karboksipeptidazların israsidin üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir.

Fontenele ve ark. (2017), Coalho peynirinde israsidinin parçalanması sonucu israsidinin orta bölgesinden KHPIKHQGLPQ ve HPIKHQGLPQ peptidlerini, israsidinin C terminal bölgesinden GLPQEVLNENLLRF, EVLNENLLRF, EVLNENLLR, VLNENLLRF ve NENLLRF peptidlerini, israsidinin N terminal bölgesinden ise RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF, RPKHPIKHQGLPQEVLNENLL, RPKHPIKHQGLPQEVLNENL, RPKHPIKHQGLPQ, RPKHPIKHQGLPQEVLNEN, RPKHPIKHQGLPQEVLN, RPKHPIKHQGLPQEVL, RPKHPIKHQGLPQEV ve RPKHPIKHQGLPQE peptidlerini tespit etmişlerdir. Bu peptidlerin birçoğu, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Bu araştırmacılar, tanımladıkları 25 α_{s1}-KN türevli peptidlerin 18 tanesinin israsidinin türevli olduğunu gözlemlemişlerdir ve karboksipeptidaz aktivitesi ile C terminalinde gerçekleşen hidroliz sonucunda israsidinin N terminal bölgesindeki peptidlerin meydana geldiği görülmektedir. Saito ve ark. (2000) Gouda peynirlerinde israsidinin hidrolizi sonucu RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerinin meydana geldiği bildirmişlerdir. Ayrıca, Sagardia ve ark. (2013) Idiazabal peynirinin 4 ay olgunlaştırılması ile israsidin peptidinin parçalanma ürünlerinin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan israsidin türevli RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF, PKHPIKHQ, RPKHPIKHQ, PKHPIKHQGLPQE, RPKHPIKHQGLPQE, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, LNENLLRF ve NENLLRF peptidleri Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde de gözlemlenmişlerdir. Bu peptidlerde ise çoğunlukla aminopeptidaz aktivitesine bağlı olarak hidrolizin N terminal bölgesinden meydana geldiği görülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, α_{s1}-KN'de israsidin peptidini takip eden bölgeden 43 adet peptidin, α_{s1}-KN (36-45), α_{s1}-KN (38-42), α_{s1}-KN (38-44), α_{s1}-KN (38-

45), α_{s1}-KN (38-48), α_{s1}-KN (38-49), α_{s1}-KN (39-43), α_{s1}-KN (39-44/caprine), α_{s1}-KN (39-44/bovine), α_{s1}-KN (39-45/caprine), α_{s1}-KN (39-45/bovine), α_{s1}-KN (39-46), α_{s1}-KN (39-47), α_{s1}-KN (39-48/caprine), α_{s1}-KN (39-48/bovine), α_{s1}-KN (39-49/caprine), α_{s1}-KN (39-49/bovine), α_{s1}-KN (39-50/caprine), α_{s1}-KN (39-50/bovine), α_{s1}-KN (39-51/caprine), α_{s1}-KN (39-51/bovine), α_{s1}-KN (39-52), α_{s1}-KN (39-53), α_{s1}-KN (39-54/caprine), α_{s1}-KN (39-54/bovine), α_{s1}-KN (39-55/caprine), α_{s1}-KN (39-55/bovine), α_{s1}-KN (40-44), α_{s1}-KN (40-45), α_{s1}-KN (40-46), α_{s1}-KN (40-48/caprine), α_{s1}-KN (40-48/bovine), α_{s1}-KN (40-49), α_{s1}-KN (40-51), α_{s1}-KN (41-45), α_{s1}-KN (41-46), α_{s1}-KN (41-47), α_{s1}-KN (41-48/caprine), α_{s1}-KN (41-48/bovine), α_{s1}-KN (41-49), α_{s1}-KN (43-47), α_{s1}-KN (43-48) ve α_{s1}-KN (50-55), meydana geldiği gözlemlenmiştir. İsrasidin bölgesinde olduğu gibi bu bölgede de karboksipeptidazların daha etkili olduğu net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, α_{s1}-KN'nin orta bölgesinden de parçalanmalar olduğu ve 11 adet peptidin, α_{s1}-KN (100-107), α_{s1}-KN (100-108), α_{s1}-KN (100-113), α_{s1}-KN (104-112), α_{s1}-KN (107-112), α_{s1}-KN (107-113), α_{s1}-KN (108-113), α_{s1}-KN (109-113), α_{s1}-KN (119-123), α_{s1}-KN (119-129) ve α_{s1}-KN (120-129), oluştuğu tespit edilmiştir. α_{s1}-KN'nin orta bölgesinde ise aminopeptidaz, karboksipeptidaz ve dipeptidaz gibi ekzopeptidazların ve endopeptidazların aktivitesine bağlı olarak yaklaşık benzer oranlarda çok çeşitli enzim aktivitesinin bulunduğu görülmektedir. Son olarak, muhtemelen proteinaz aktivitesine bağlı olarak α_{s1}-KN'in C terminal bölgesine yakın bir bölgeden 1 peptid, α_{s1}-KN (146-157), gözlemlenmiştir. Chang ve ark. (2014) *S. thermophilus* 4F44 suşunda bulunan hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesine bağlı olarak bu peptidin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, Fan ve ark. (2019) *L. helveticus* CICC6024 suşunun aktivitesine bağlı olarak bu peptidin, QKEPMIGVNQEL, oluştuğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN üzerindeki diğer bölgelere kıyasla israsidin peptidini takip eden bölgeden daha fazla peptidin meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde israsidin peptidini takip eden bölgeden tanımlanan FVAPFPEVFGK, FVAPFPEVFGKEKV, FVAPFPEVFGKEKVN ve FVAPFPEVFGKEKVNE peptidleri Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirinde de tanımlanmışlardır. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde israsidin peptidini takip eden bölgeden belirlenen VVAPFPEV, VVAPFPE, VVAPFP, VAPFPE, VAPFP, APFPE ve ENINEL peptidleri Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteazların koyun ve inek sütünde israsidin peptidini takip eden sıradaki FVVAPFPE, FVVAPFP, VAPFPEVFG, FVAPFPE, VAPFPE, APFPEVF ve FPEVF

peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Benzer peptidler bu çalışmada da tanımlanmıştır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'in orta bölgesinden meydana gelen DVPSERYLG, DVPSERYL, GYLEQL peptidlerine 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirin suda çözünebilir ekstraktlarında da rastlanmıştır (Gómez-Ruiz ve ark., 2004). Bununla birlikte, α_{s1}-KN'in orta bölgesinden belirlenen NVPQL peptidi 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde de tespit edilmiştir (Sommerer ve ark., 2001).

Demirci (2019) Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında *E. faecium* suşlarının baskın olduğunu, bunu sırasıyla *Lc. lactis*, *L. plantarum, E. hirae* suşlarının takip ettiğini ve daha az oranda *L. brevis, L. helveticus, E. durans* ve *Leu. mesenteroides* suşlarının bulunduğunu bildirmiştir. Ayrıca, bu araştırmacı 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise *E. faecium* ve *E. hirae* suşlarının baskın olduğunu, bu suşlardan sonra *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *S. thermophilus* suşlarının çoğunlukla bulunduğunu ve daha düşük oranlarda *L. brevis, E. faecalis* ve *E. hirae* suşlarının bulunduğunu tespit etmiştir. Dolayısıyla bu suşlara ait proteolitik enzimlerin Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenen peptidlerin oluşumunda büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Sadat-Mekmene ve ark. (2011) *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'nin N terminal bölgesinden C terminal bölgesine kadar çok çeşitli bölgelerde etkinlik göstermesi sonucu yüksek sayıda peptidin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bounouala ve ark. (2017) ise inek ve koyun sütlerinde *L. brevis*' ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile α_{s1}-KN türevli 22 peptid tanımlamışlardır ve ilgili araştırmacılar *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların C terminal bölgesinde bulunan lizin, fenilalanin, lösin ve tirozin bağlarını etkilediğini tespit etmişlerdir. Solieri ve ark. (2018) *L. rhamnosus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN üzerinde çeşitli bölgelerde etkili olduğu ve özellikle hidrofobik veya negatif yüklü amino asitlerin bulunduğu bağları parçaladığını bildirmişlerdir.

Georgalaki ve ark. (2017) *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* ile 24 saat fermente edilen inek sütünde yüksek oranda israsidinin N terminal bölgesinden gelen peptidlerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *S. thermophilus*'a ait proteolitik enzimlerin *L. bulgaricus*'a kıyasla çok yüksek düzeyde X-prolil dipeptidil peptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya ek olarak, Hafeez ve ark. (2015) *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazların, hücre dışı aminopeptidazların, karboksipeptidazların ve X-prolil dipeptidil peptidazların israsidin ve israsidin türevli peptidlerin meydana gelmesinde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir.

Requena ve ark. (1993) geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğunu ve *Lc. lactis*'e ait hücre içi enzimlerin N terminalinde bulunan lizine karşı yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar ilgili suşlar arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini *L. plantarum* suşlarında belirlemişlerdir. Herreros ve ark. (2003) İspanyol Armada peynirinden izole edilen *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ve *L. plantarum* suşlarına ait proteolitik enzimlerin alanin, lizin ve lösin bağları üzerinde yüksek düzeyde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar, *Leu. mesenteroides* suşlarının düşük karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, González ve ark. (2010) İspanyol peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 suşunun *Leu. mesenteroides, Leu. pseumesenteroides, L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, *Lc. lactis* GE 2363 suşunun N terminalinde bulunan lizin, prolin ve lösine karşı aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini, *L. plantarum* GE 2077 suşunun ise yalnızca lösine karşı *Lc. lactis* GE 2363 suşuna kıyasla daha az oranda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bounouala ve ark. (2017) *Lc. lactis*'e ait proteazların koyun ve inek sütünde israsidin peptidini takip eden sıradaki FVVAPFP, FVVAPFPE, FVVAPFPEVP, FVAPFPE, VAPFPE, VAPFPEVF, VAPFPEVFG, APFPEVF, FPEVF peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu peptidlerin oluşumunda yüksek düzeyde gerçekleşen karboksipeptidaz aktivitesini takiben aminopeptidaz aktivitesinin de olduğu görülmektedir.

Igoumenidou ve ark. (2005) Feta peynirinden izole edilen *E. durans* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'in hidrolizinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Veljovic ve ark. (2009) fermente edilmiş gıdalardan izole edilen *E. faecalis* suşlarına ait hücre dışı proteinazların α_{s1}-KN'in yüksek oranda hidrolizine neden olduğunu bildirmişlerdir. Suzzi ve ark. (2000) geleneksel İtalyan keçi peynirlerinden izole edilen enterokok suşları arasında en yüksek hücre dışı proteolitik aktivitenin *E. faecalis* suşlarında olduğunu ve bunu sırasıyla *E. faecium* ve *E. hirae*'nin takip ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, geleneksel İspanyol peynirlerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği ve buna kıyasla daha düşük oranda aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (González ve ark., 2010). Bu araştırmacılar *E. faecalis*'e ait proteolitik enzimlerin dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini de tespit etmişlerdir. Serio ve ark. (2010) ise Pecorino Abruzzese peynirinden izole edilen

E. faecalis ve *E. durans* suşlarına ait hem hücre içi hem hücre dışı proteolitik enzimlerin *E. faecium* suşlarına kıyasla daha yüksek lizil aminopeptidaz, arjinin aminopeptidaz ve X-prolil dipeptidil aminopeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN üzerinde gözlemlenen karboksipeptidaz aktivitesinin özellikle, *Lc. lactis, S. thermophilus* ve *E. faecalis* suşlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, aminopeptidaz aktivitesinde ise özellikle *E. faecalis, E. durans, Lc. lactis*, *L. plantarum, Leu. mesenteroides* ve *S. thermophilus* suşlarına ait proteolitik enzimlerin önemli bir rol aldığı öngörülmektedir. Ayrıca, proteinaz aktivitesinin ise özellikle *Lc. lactis*, *L. brevis, L. rhamnosus*, *S. thermophilus, E. faecalis, E. faecium, E. hirae* ve *E. durans* suşlarına ait proteolitik enzimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerindeki muhtemel dipeptidaz aktivitesinden ise özellikle *L. plantarum* ve *E. faecalis* suşlarının sorumlu olduğu düşünülebilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresi boyunca gerçekleşen proteolize bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. Olgunlaşma süresinin başında 37 α_{s1}-KN türevli peptid belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda ise 66 α_{s1}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid sayısında artış gözlemlemiş olup olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla 8. ayında daha fazla α_{s1}-KN türevli peptidinin oluştuğunu belirlemişlerdir. Ancak, bu çalışmanın bulgularından farklı olarak, Gagnaire ve ark. (2011) Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılmasından sonra peptid sayısının 34'ten 13'e düştüğünü bildirmişlerdir. Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, bazı peptidlerin amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması, bazı peptidlerin peynirde birikmesi ve bazılarının ise hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir. Ayrıca, Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla sayıda α_{s1}-KN türevli peptid gözlemlenmiştir. Bu durum, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN üzerinde proteolitik sistemin daha etkili olduğunu göstermektedir. Proteolitik sistemin etkinliğinin; peynir üretim metoduna, kullanılan süt çeşidine, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine ve peynirde bulunan mikrobiyotaya bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 88 farklı çeşitte α_{s1}-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 27 peptidin,

RPKHPIKHQ, GLSPEVL, VLNENLLRF, LNENLLRF, VLNENLLR, VLNENLL, LNENLLR, NENLLRF, ENLLRF, NLLRF, VLNENL, LNENLL, VVAPFPEVFRK, VVAPFPEVFR, FVVAPFPE, FVVAPFP, VVAPFPEVF, VVAPFPEV, VVAPFPE, VAPFPEV, VVAPFP, VAPFPE, APFPE, VVAPF, VAPFP, DVPSERYL ve YLEQL, 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin farklı aşamalarında korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de belirlenmiş olup, olgunlaşma süresince bu peptidlerin devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu korunmuş peptidlerden α_{s1}-KN'in orta bölgesinde bulunan DVPSERYL ve YLEQL dışındaki peptidlerin hepsinin α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği görülmektedir. Bu korunmuş peptidlerin %44'ünün israsidinin parçalanma ürünlerinden, %48'inin ise α_{s1}-KN'de israsidini takip eden bölgenin parçalanmasıyla meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde ENL ve APF'yi içeren korunmuş sekansların da bulunduğu fark edilmiştir. Gagnaire ve ark. (2011) da Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca RPKHPIKHQ, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, NENLLRF ve FVAPFPEVFGKEKV peptidlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacı da genellikle israsidin kökenli ve israsidin peptidini takip eden bölgelerden peptidlerin kaldığını tespit etmiştir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) geleneksel olarak üretilen Manchego peynirlerinin olgunlaşma süresinin 4. ve 8. aylarında israsidin türevli HPIK, VLNENL, LNEN, LNENL, NLLR peptidlerinin ve israsidin peptidini takip eden bölgelerden VVAPFPE, VAPFPE, APFPE, KENIN, ENINEL, NINE, INEL peptidlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptidlerden 10 tanesi, Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Bunlar haricinde, Ereğli yöresindeki bu korunmuş peptidlerden 4 tanesi (RPKHPIKHQ, LNENLLRF, NENLLRF, VVAPFPEV) Anamur yöresi ile, 5 tanesi (GLSPEVL, VVAPFPEVFRK, VVAPFPEV, FVVAPFP, VAPFPEV) Mut yöresi ile ve 7 tanesi (NENLLRF, LNENLLR, LNENLL, YLEQL, VAPFPEV, VAPFP, APFPE) Karaman yöresi ile ortak bulunmuştur. Ancak, bu yörelerden farklı olarak Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde DVPSERYL, VVAPFPEVF, VVAPF ve NLLRF peptidlerinin olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu belirlenmiştir. Korunmuş peptidlerde gözlemlenen bu değişimlerin tulum peynirlerindeki proteolitik enzimlerin çeşitliliğinden ve aktivitelerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum da peynir

üretim metoduna, kullanılan süte ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olmaktadır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-KN türevli peptidler ve peptid dinamiği bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antifungal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, antikarsinojenik, antienflamatuar, antidiyabetik (tip II), obezite önleyici ve cilt yenileyici olmak üzere 12 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Peptid sayısının da daha yüksek olduğu Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde Anamur, Mut ve Karaman yörelerine kıyasla daha fazla çeşitlilikte biyoaktif özelliklerin belirlenmesi şaşırtıcı değildir. Dolayısıyla, bu yörelerden farklı olarak Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan farklı peptidlerin biyoaktif potansiyele sahip olduğu görülmektedir. En fazla ACE inhibitörü peptidlere rastlanmış olup bunu antibakteriyal peptidler takip etmiştir.

α_{s1}-KN türevli 25 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği ve dolayısıyla biyoaktif peptidler arasında ACE inhibitörü peptid sayısının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile farklı ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği görülmektedir. Ereğli yöresinde belirlenen α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptidler; RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLR, RPKHPIKHQGLSPE, RPKHPIKHQGLPQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQ, EVLNENLLRF, VLNENLLRF, VLNENLL, ENLLRF, VLNENL, NLLRF, FVAPFPEVFGKEKVNE, FVAPFPEVFGK, FVAPFPEVFG, FVVAPFPE, VVAPFPEVFRKE, VAPFPEVFGK, VVAPFPEVF, VAPFPEVFG, VVAPFPE, VAPFPEV, FVVAPFP, FVAPFPE, APFPE ve DVPSERYLG peptidlerinden oluşmaktadır. DVPSERYLG dışında antihipertansif bu peptidlerin, israsidin bölgesinden (11) ve israsidin bölgesini takip eden bölgeden (13) gelen peptidler olduğu görülmüştür. İsrasidinin N terminal ve C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana gelen peptidlerin antihipertansif özellik gösterdiği dikkat çekmektedir. Bounouala ve ark. (2017) koyun ve inek sütlerinde *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların etkisiyle oluşan FVVAPFPE, FVVAPFP, FVAPFPE, VVAPFPE, FVVAPFPEVF, DVPSERY, APFPEVF, VAPFPEVFG, VAPFPEVF peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar da antihipertansif peptidleri, israsidin bölgesini takip eden bölgelerden belirlemişlerdir. Saito ve ark. (2000) Gouda peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra yüksek antihipertansif etki gösteren RPKHPIKHQG ve RPKHPIKHQ peptidlerini tanımlamışlardır. Ruiz ve ark. (2004) 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirinden izole

edilen DVPSERYLG peptidinin %82.7 ACE inhibisyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. ACE inhibitörü özellik gösteren biyoaktif peptidler, genel olarak C terminal bölgesinde bulunan son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen ACE inhibitörü peptidlerin 14 tanesinde fenilalanin (F), lösin (L), valin (V), glisin (G), arjinin (R) ve prolin (P)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, diğer ACE inhibitörü peptidlerin C terminal ucundaki son üç amino asitten birinin hidrofobik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2006) C terminal ucunda hidrofobik fenilalanin amino asidi bulunan peptidlerin prolin amino asidi bulunduranlara kıyasla daha düşük ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

APFPE peptidinin ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü ve GLP-1 sekresyonunu artırıcı özelliklere sahip çok fonksiyonlu bir peptid olduğu belirlenmiştir (Boots, 2012; 2013; Abdel-Hamid ve ark., 2017). Bu multifonksiyonel peptid, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tüm olgunlaşma süresi boyunca tespit edilmiştir. ACE inhibitörü ve DPP-4 inhibitörü özelliklerine sahip çok fonksiyonlu bir diğer peptid olan VAPFPEVFGK peptidi olgunlaşma süresinin 30. gününden olgunlaşma süresinin sonuna kadar gözlemlenmiştir. İnsülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik gösteren bir diğer peptid olan LNENLLR ise tüm olgunlaşma süresi boyunca belirlenirken, diğer DPP-4 inhibitörü peptidler olan GLPQEVL ve APFPEVF olgunlaşma süresinin 30. gününden itibaren olgunlaşma süresinin sonuna kadar tespit edilmiştir. Ayrıca, GLPQEVL peptidinin *Debaryomyces hansenii* mayasına karşı düşük düzeyde antifungal özellik gösterdiği bildirilmiştir (McNair ve ark., 2018). GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve dolasıyla insülin salımının artmasına bağlı olarak iştahı azaltan diğer peptidlerden LNENLLRF ve NENLLRF tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. GLP-1'in insülin sekresyonunu artırdığı, iştahı azalttığı, gastrik boşalmayı geciktirdiği ve kilo verdirdiği bildirilmiştir (Güler ve Demir Önal, 2015).

Cilt yenileyici özellik gösteren FVAPFP peptidi, olgunlaşma süresinin 30. gününden itibaren olgunlaşma süresinin sonuna kadar görülmüştür. FVAPFP peptidinin kollajen sentezini artırdığı bildirilmiştir (Gorouhi ve Maibach, 2009). Antienflamatuar, antidiyabetik (tip II) ve obezite önleyici özelliklere sahip çok fonksiyonlu FVAPFPEVFGKEKV peptidi olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde hem antibakteriyal hem de immünomodülatör özellik gösteren israsidin peptidi,

RPKHPIKHQGLSPEVLNENLLRF, olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar gözlemlenmiştir. Lahov ve Regelson (1996) israsidin peptidinin *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı antibakteriyal özellik gösterdiğini, laktobasillerin gelişimini inhibe ettiğini ve 0.1-1 mg/mL'lik yüksek konsantrasyonlarda çeşitli Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar, israsidinin terapötik (iyileştirici) ve profilaktik (hastalık önleyici) olması sonucu farelerde uzun süreli bağışıklık direnci oluşturduğunu, fagositoz ve bağışıklık tepkilerinin uyarılmasıyla fareleri *Candida albicans* enfeksiyonuna karşı koruduğunu tespit etmişlerdir.

İsrasidin dışında antibakteriyal özelliklere sahip israsidin türevli PKHPIKHQ, RPKHPIKHQGLPQE, VLNENLLR peptidleri ve israsidin bölgesini takip eden bölgeden FVAPFPEVFGKEK, VVAPFPEV peptidleri tespit edilmiştir. VLNENLLR, PKHPIKHQ ve VVAPFPEV tüm olgunlaşma süresinde gözlemlenirken, RPKHPIKHQGLPQE olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinde ve FVAPFPEVFGKEK ise olgunlaşma süresinin 30. gününden 180. gününe kadar gözlemlenmiştir. Diğer yörelere kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla antibakteriyal peptid meydana gelmiştir. Rizzello ve ark. (2005) İtalyan peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarından izole edilen VVAPFPEV peptidinin *Lactobacillus sakei, Lactobacillus helveticus, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Escherichia coli, Bacillus megaterium, Listeria innocua, Staphylococcus aureus, Salmonella* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı antibakteriyal özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hayes ve ark. (2006) VLNENLLR peptidinin *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 ve *Escherichia coli* DPC5063'e karşı yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Fialho ve ark. (2018) Canastra minas peynirinden izole edilen RPKHPIKHQGLPQE ve PKHPIKHQ peptidlerinin *Escherichia* coli'ye karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Rana ve ark. (2018) *L. rhamnosus* ile fermente edilen sütlerden izole edilen FVAPFPEVFGKEK peptidinin *Escherichia* coli'ye karşı antibakteriyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hem antioksidan hem de ACE inhibitörü özellik gösteren VLNENLL peptidine tüm olgunlaşma süresi boyunca ve FVAPFPE peptidine olgunlaşma süresinin 30. gününden 180. gününe kadar rastlanmıştır. Bunlara ek olarak, ACE inhibitörü, antikarsinojenik ve antioksidan özelliklerine sahip çok fonksiyonlu diğer bir peptid olan NLLRF ise tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ayrıca, antioksidan özellik gösteren diğer NENLL ve FVAPFPEVFGKE peptidleri de Ereğli yöresine ait tulum

peynirlerinde belirlenmiştir. NENLL peptidi olgunlaşma süresinin 60., 90. ve 180. günlerinde ve FVAPFPEVFGKE peptidi olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin (Y) amino asitlerini içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen antioksidan peptidler de bu durumla tutarlılık göstermektedir. VLNENLL peptidinin N terminal bölgesinde hidrofobik valin amino asidi bulunmaktadır. Bununla birlikte, FVAPFPE peptidi fenilalanin ve prolin amino asitlerini, NENLL peptidi lösin amino asidini ve FVAPFPEVFGKE peptidi ise fenilalanin ve prolin amino asitlerini içermektedir.

4.3.4.2. α_{s2}-kazein türevli peptidler

Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.27.'de sunulmaktadır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 9 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerindekinden daha yüksek bulunurken, Karaman yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Yöreler arasında α_{s2}-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen farklılıkların tulum peyniri üretiminde kullanılan süt çeşidi, süt kompozisyonu, koagülant çeşidi, koagülant miktarı, mevcut peynir mikrobiyotası ve üretim yöntemi ile ilgili farklılıklara bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin, 5 tanesinin orta bölgeden ve 4 tanesinin C terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, Anamur ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde olduğu gibi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de α_{s2}-KN'in N terminal bölgesinden meydana gelen peptidler gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgesinden oluştuğu görülmektedir. Peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptidlerin genellikle α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinin parçalanmasıyla meydana geldiği birçok çalışmada da bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2011; Sagardia ve ark., 2013; Pisanu ve ark., 2015; Fontenele ve ark., 2017).

Çizelge 4.27. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan α_{s2}-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	18.481	689.3395	α_{s2}-KN (132-138)	Caprine	AGPFTPT	-	-					*
2	18.634	861.4971	α_{s2}-KN (191-197)	Bovine	LPQYLKT	-	-		*	*	*	
3	18.707	712.3921	α_{s2}-KN (218-222)	Caprine	YVRYL	-	-	*				
4	19.243	763.3532	α_{s2}-KN (98-103)	Bovine	NEINQF	-	-		*			
5	24.269	1762.9530	α_{s2}-KN (116-130)	Bovine	QGPIVLNPWDQVKRN	-	-				*	
6	25.488	1811.9658	α_{s2}-KN (115-129)	Bovine	YQGPIVLNPWDQVKR	ACE inhibitörü	Meira ve ark. (2012)			*	*	*
7	25.718	1079.5984	α_{s2}-KN (189-197)	Bovine	FALPQYLKT	-	-		*	*	*	
8	26.709	1492.8067	α_{s2}-KN (116-128)	Bovine	QGPIVLNPWDQVK	-	-				*	*
9	26.478	993.5642	α_{s2}-KN (216-223)	Caprine	AIPYVRYL	Antibakteriyal	Sanchez ve ark. (2013)	*				
Toplam								**2**	**3**	**3**	**5**	**3**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: NP_776953, NP_001272514, NP_001009363). KN: kazein.
[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü.
[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

α_{s2}-KN'in, plazmin enzimine karşı oldukça hassas olduğu ve bununla birlikte kimozin enzimine karşı α_{s1}-KN'e kıyasla daha dirençli olduğu bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994; Fox ve McSweeney, 1996). Plazmin enziminin α_{s2}-KN üzerinde özellikle lizin amino asidi (K) ve daha sonra arjinin amino asidi (R) bulunan bağlarda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Bu enzimin aktivitesi ile α_{s2}-KN'in çoğunlukla C terminal ve orta bölgelerinden peptidlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Dalsgaard ve ark., 2008). Ayrıca, sütte doğal olarak bulunan diğer bir enzim olan katepsin D'nin α_{s2}-KN'nin orta ve C terminal bölgelerinde bulunan lösin (L) ve tirozin (Y) bağlarında etkili olduğu tespit edilmiştir (Larsen ve ark., 1996). Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgesinden tanımlanan peptidler bu enzimlerin aktivitesini desteklemektedir. Bunlara ek olarak, peynirlerin olgunlaşma süresince mikrobiyal proteolitik enzimler de α_{s2}-KN'in ileri derecede hidrolizinde görev alabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Solieri ve ark., 2018; Rubak ve ark., 2020).

Koagülant olarak fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) enzim, starter kültür olarak termofilik laktik asit bakterileri (streptokok ve laktobasil) ve ikincil starter olarak propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 9 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tanımlanmıştır (Gagnaire ve ark., 2001). Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, koagülant olarak rennet ve starter kültür olarak *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) suşları kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılmasından sonra 12 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2004). Pıhtısı haşlanan bir peynir çeşidi olan Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaşma süresince ise toplam 17 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid belirlenmiştir (Gagnaire ve ark., 2011). Çiğ koyun sütünden üretilen ve 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 11 çeşit α_{s2}-KN türevli peptid tespit edilmiştir (Sagardia ve ark., 2013). Koagülant olarak kimozin kullanılan ve çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde toplam 5 adet α_{s2}-KN türevli peptid tanımlanmıştır (Fontenele ve ark., 2017). Manchego, Ragusano ve Idiazabal peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen peptid sayısından daha yüksek bulunurken, Coalho peynirlerinde belirlenen α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerindeki α_{s2}-KN türevli peptidlerden YQGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVKRN peptidleri Ragusano peynirinde de gözlemlenmiştir. Ayrıca, YQGPIVLNPWDQVKR

peptidine Coalho peynirinde de rastlanmıştır. Ancak, genel olarak Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidler çeşit bakımından bu peynirlerden oldukça farklılık göstermektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmalara dayanarak, peynirlerde α_{s2}-KN türevli peptid sayısında ve çeşidinde gözlemlenen farklıkların üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem uygulanıp uygulanmamasına, koagülant miktarına, koagülant çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan α_{s2}-KN türevli peptidlerin 5-15 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler arasında hekzapeptidlerin, heptapeptidlerin ve pentadekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu görülmüştür. Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla, Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde daha uzun amino asit dizilimlerinden oluşan α_{s2}-KN türevli peptidler tanımlanmıştır. Bu durum proteolitik enzim çeşitliliğinin ve dolayısıyla enzim aktivitesinin Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden farklı olduğunu göstermektedir.

Gagnaire ve ark. (2001) tarafından 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 4-32, Sommerer ve ark. (2001) tarafından 3 hafta olgunlaştırılan keçi peynirlerinde 4-6, Gómez-Ruiz ve ark. (2004) tarafından 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 4-10, Gagnaire ve ark. (2011) tarafından 4 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirlerinde 7-16, Sagardia ve ark. (2013) tarafından 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 ve Fontenele ve ark. (2017) tarafından Coalho peynirlerinde 5-16 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-KN türevli peptidler tanımlanmıştır. 6 ay olgunlaştırılan Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid uzunluğu Ragusano, Idiazabal ve Coalho peynirlerinde gözlemlenen α_{s2}-KN türevli peptidlere daha yakın bulunmasına rağmen, genel olarak bu peynirlerde farklı α_{s2}-KN türevli peptidler belirlenmiştir. Farklı peynirlerin α_{s2}-KN türevli peptid uzunluğunda ve çeşitliliğinde gözlemlenen değişimler, daha önce de belirtildiği gibi proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

Biyoaktif potansiyele sahip peptidlerin 2-20 amino asit R gruplarını içeren kısa peptidlerden oluştuğu bildirilmiştir (Hartmann ve Meisel, 2007). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen kısa zincirli α_{s2}-KN türevli peptidlerden 2 tanesinin

antibakteriyal ve ACE inhibitörü olmak üzere 2 farklı biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen AIPYVRYL, α_{s2}-KN (216-223), peptidinin Gram pozitif bakterilere, özellikle *Staphylococcus* cinsine karşı yüksek düzeyde antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Sanchez ve ark., 2013). Ancak, bu araştırmacılar *Escherichia coli* ve *Serratia marcesens* gibi Gram negatif bakterilerin AIPYVRYL peptidinin etkisine karşı dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen YQGPIVLNPWDQVKR peptidi çiğ koyun sütünden üretilen ve 90 gün olgunlaştırılan Rokfor peynirinde de belirlenmiştir (Meira ve ark., 2012). İlgili araştırmacılar bu peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

α_{s2}-KN üzerinde 90-120 ve 160-207 bölgelerinden oluşan iki hidrofobik alanın bulunduğu bildirilmiştir (Swaisgood, 1992). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde üç peptidin, α_{s2}-KN (98-103), α_{s2}-KN (189-197) ve α_{s2}-KN (191-197), hidrofobik bölgeden ve üç peptidin α_{s2}-KN (132-138), α_{s2}-KN (218-222) ve α_{s2}-KN (216-223), hidrofilik bölgeden meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, 3 peptidin, α_{s2}-KN (115-129), α_{s2}-KN (116-128) ve α_{s2}-KN (116-130), ise hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri içeren peptidlerden meydana geldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN üzerinde çok çeşitli proteolitik enzim aktivitesi görülmüştür.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrofobik bölgesinde belirlenen NEINQF, FALPQYLKT ve LPQYLKT peptidleri kalan koagülant yani kimozin aktivitesine, plazmin aktivitesine, katepsin D aktivitesine veya mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. NEINQF peptidi Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Bu peptidlerin hidrofobik bölgelerde bulunması kimozin aktivitesini düşündürmektedir. Çünkü kimozin enziminin α_{s2}-KN üzerinde yalnızca hidrofobik bölgelerde aktivite gösterdiği bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994). Bununla birlikte, α_{s2}-KN üzerinde NEINQF peptidinin hemen öncesinde bulunan lösin amino asidi (L) ve sonrasında bulunan tirozin amino asidi (Y) bu amino asit bağlarında etkili katepsin D aktivitesinin de olabileceğini düşündürmektedir (Larsen ve ark., 1996). Ayrıca, LPQYLKT peptidinin başında da katepsin D enziminin etkili olduğu lösin amino asidi bulunmaktadır. α_{s2}-KN üzerinde FALPQYLKT peptidinden hemen önce bulunan lizin amino asidi (K) lizin bağlarında etkili plazmin enzimini akla getirmektedir (Bastian ve ark., 1997). Diğer taraftan, Rana ve ark. (2018) *L. rhamnosus* ile fermente edilen sütlerde FALPQYLKTV peptidinin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Fan ve ark. (2019) ise *L. helveticus*'a ait hücre içi enzimlerin NEINQFYQ

peptidini oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde FALPQYLKT ve LPQYLKT peptidlerinin kazosidin türevli olduğu görülmektedir. Kazosidin, antibakteriyal özelliklere sahip ve 39 amino asitten oluşan (KTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQK) α_{s2}-KN türevli bir peptiddir (Zucht ve ark., 1995). Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait proteolitik enzimlerin kazosidin türevli LPQYLKTVYQHQK peptidini meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Dolayısıyla, bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, hidrofobik bölgedeki bu peptidlerin oluşumunda mikrobiyal enzimler de görev almış olabilir. Zaten, LPQYLKT peptidinin muhtemelen Phe-Ala üzerindeki dipeptidaz aktivitesine bağlı olarak FALPQYLKT peptidinden meydana geldiği öngörülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hidrofilik bölgelerinden ise AGPFTPT, AIPYVRYL ve YVRYL peptidleri tanımlanmıştır. Bu peptidlerin, mikrobiyal proteolitik enzimlerle meydana geldiği düşünülmektedir. Çünkü C terminal bölgesinde bulunan AIPYVRYL ve YVRYL peptidlerinin öncesinde ve orta bölgede bulunan AGPFTPT peptidinin öncesinde veya sonrasında plazmin ve katepsin D enziminin etkili olduğu lizin, arjinin, lösin ve tirozin amino asitlerine ait bağlar bulunmamaktadır. AGPFTPT peptidine Mut ve Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, AIPYVRYL peptidi Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. α_{s2}-KN'in C terminal bölgesinde bulunan YVRYL peptidinin AIP üzerindeki tripeptidaz aktivitesine bağlı olarak AIPYVRYL peptidinden oluştuğu düşünülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN'in hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelerini içeren YQGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVKRN ve QGPIVLNPWDQVK peptidleri belirlenmiştir. Genel olarak bu peptidlerin, sütte bulunan doğal enzimlerin ve mevcut mikrobiyotaya ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bu peptidlerden, YQGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidlerine Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Bu peptidlerin başında veya sonunda ya da α_{s2}-KN üzerinde bu peptidleri takip eden amino asitlerde plazmin ve katepsin D enzimlerinin aktivite gösterdiği lizin (K), arjinin (R), tirozin (Y) ve lösin (L) amino asitlerine ait bağlar bulunmaktadır. Ayrıca, bu peptidler mikrobiyal proteolitik enzimlerin aktivitesiyle de meydana gelmiş olabilir. *S. thermophilus* 4F44 suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların YQGPIVLNPWDQVKR peptidini meydana getirdiği bildirilmiştir (Chang ve ark.,

2014). *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile fermente edilen sütlerde ise QGPIVLNPWDQVK peptidinin meydana geldiği tespit edilmiştir (Tonolo ve ark., 2020). Bununla birlikte, *L. helveticus*'a ait hücre dışı enzimlerin aktivitesi ile de QGPIVLNPWDQVK peptidinin meydana geldiği belirlenmiştir (Fan ve ark., 2019). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri içeren QGPIVLNPWDQVK peptidinin aminopeptidaz ve karboksipeptidaz aktiviteleri ile YQGPIVLNPWDQVKR peptidinden meydana geldiği düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerine ek olarak, YQGPIVLNPWDQVKR peptidi Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011), Rokfor (Meira ve ark., 2012) ve Coalho (Fontenele ve ark., 2017) peynirlerinde de belirlenmiştir. Ayrıca, QGPIVLNPWDQVKRN peptidi de Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011) peynirlerinde belirlenmiştir.

Demirci (2019) Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca *E. faecium* suşlarının baskın olduğunu belirlemiştir ve bu olgunlaşma süresince peynirlerde *E. hirae, E. durans, E. faecalis, L. helveticus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. brevis, Lc. lactis, Leu. mesenteroides* ve *S. thermophilus* suşlarının da bulunduğunu tespit etmiştir. Bu mikrobiyotaya ait dipeptidaz, tripeptidaz, endopeptidaz, aminopeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenen α_{s2}-KN türevli peptidlerin oluşumunda rol oynadığı düşünülmektir. Ayrıca, Demirci (2019) Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinden farklı olarak Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde *L. helveticus, L. rhamnosus* ve *Leu. mesenteroides* suşlarının bulunduğunu gözlemlemiştir. Dolayısıyla, bu farklı mikrobiyota Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde farklı çeşitlilikte α_{s2}-KN türevli peptidlerin meydana gelmesine neden olmuş olabilir.

Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların koyun sütünde α_{s2}-KN'in orta bölgesinden YQKFPQY, LYQGPIVLNPW ve YQGPIVLNPW peptidlerini meydana getirdiğini ve *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile inek sütünde ise α_{s2}-KN türevli peptidlerin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar *Lc. lactis*'e hücre dışı proteinazların koyun sütünde VSSSEEPINI, ALNEINQF, FPQYL, ISQYYQK, FAWPQY, TNAIPY peptidlerini ve inek sütünde ise yalnızca NPWDQ peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, meydana gelen α_{s2}-KN türevli peptidlerin suş ve süt türüne göre değiştiği görülmektedir.

González ve ark. (2010) geleneksel bir İspanyol peyniri olan Genestoso peynirinden izole edilen *Lc. lactis, L. plantarum* ve *E. faecalis* suşlarının Phe-Ala dipeptidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Herreros ve ark.

(2003) Armada peynirinden izole edilen *Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis* ve *Leu. mesenteroides* suşlarının da Phe-Ala dipeptidaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, de Palencia ve ark. (2000) *L. helveticus* suşuna ait PepC enziminin Phe-Ala dipeptidi üzerinde %81 düzeyinde aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Pan ve Tanokura (2004) ise *L. helveticus* suşuna ait dipeptidazların N terminal bölgesinde lösin, alanin veya fenilalanin içeren dipeptidleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde LPQYLKT peptidinin oluşumunda öngörülen Phe-Ala dipeptidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir.

Solieri ve ark. (2018) *L. rhamnosus* PRA331 ve *L. casei* PRA205 suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}- ve β-KN'e kıyasla α_{s2}-KN'i daha az oranda hidroliz ettiğini bildirmişlerdir. Rana ve ark. (2018) *L. rhamnosus* C6 suşu ile fermente edilen sterilize sütlerde α_{s2}-KN türevli FALPQYLKTV, NAVPITPTLN ve NFLKKISQ peptidlerinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. FALPQYLKTV peptidine benzer FALPQYLKT peptidi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Fan ve ark. (2019) *L. helveticus* CICC6024 suşuna ait hücre içi enzimlerin NAVPITPTL, NEINQFYQ, NEINQFYQKFPQ, VATEEVKITVD, VPITPTLNRE, VPITPTLNREQ, VPITPTL, VPITPTLN, VPITPTLNR, YQGPIVLNPWDQVKRN, QGPIVLNPWDQVKRN, QGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidlerini meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu peptidlerden, QGPIVLNPWDQVK peptidi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, Robert ve ark. (2004) *L. helveticus* NCC 2765 suşunun α_{s2}-KN türevli LPQYLKTVYQHQKA peptidini meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Macedo ve ark. (2000) Serra da Estrela peynirinden izole edilen *L. paracasei, Leu. mesenteroides, Lc. lactis* ve *E. faecium* suşlarının C terminalinde bulunan arjinin amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak, bu suşlar arasında arjinin amino asidine karşı en yüksek karboksipeptidaz aktivitesini *Lc. lactis* ve *E. faecium* suşları göstermiştir. Bununla birlikte, *L. helveticus* ve *S. thermophilus* (PepN) suşlarının N terminal bölgesinde bulunan tirozin amino asidine karşı aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Sasaki ve ark., 1996; Chavagnat ve ark., 1999). Dolayısıyla, YQGPIVLNPWDQVKR peptidinden QGPIVLNPWDQVK peptidinin oluşumunda C terminalindeki arjinin amino asidi üzerinde gerçekleştiği öngörülen karboksipeptidaz aktivitesi ve N terminalindeki tirozin amino asidinde gerçekleştiği düşünülen aminopeptidaz aktivitesi bu suşlardan kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, *S. thermophilus* (Somkuti ve Paul, 2010), *Lc. lactis* (Baankreis ve Exterkate, 1991) ve *L.*

helveticus (Pan ve Tanokura, 2004) suşlarının tripeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Baankreis ve Exterkate (1991) *Lc. lactis* suşuna ait tripeptidazın (PepT) prolin içeren tripeptidleri hidroliz ettiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Pan ve Tanokura (2004) *L. helveticus*'a ait tripeptidazın lösin, alanin ve fenilalanin içeren tripeptidleri parçaladığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli AIPYVRYL peptidinden YVRYL peptidinin oluşumunda AIP üzerinde gerçekleştiği düşünülen tripeptidaz aktivitesinde bu suşlar rol almış olabilir. Çünkü AIP, alanin ve prolin gibi hidrofobik amino asitleri içermektedir.

Miclo ve ark. (2012) tarafından fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesi ile belirlenen α_{s2}-KN türevli YQGPIVLNPWDQVKR, QGPIVLNPWDQVKRN, QGPIVLNPWDQVK, FALPQYLKT peptidleri Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de tanımlanmıştır. Somkuti ve Paul (2010) *S. thermophilus* suşlarının aminopeptidaz, prolinaz, dipeptidaz, tripeptidaz ve endopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının ise aminopeptidaz, prolinaz ve endopeptidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a ait proteinazların ve peptidazların α_{s2}-KN türevli kazosidin peptidini parçaladıklarını tespit etmişlerdir.

Gerçekleştirilen bir çalışmada, *E. faecium, E. faecalis* ve *E. avium* suşlarına ait hücre dışı proteinazların aktivitesi ile α_{s2}-KN türevli peptidlerin meydana gelmediği belirlenmiştir (Veljovic ve ark., 2009). Diğer bir çalışmada ise, *E. faecalis* suşunun *E. faecium, E. hirae, E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarına kıyasla 10 ve 37 °C'de proteolitik aktivitesinin daha yüksek olduğu, 37 °C'de *E. faecium* suşunun düşük proteolitik aktiviteye sahip olduğu ve 10 °C'de *E. hirae, E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının proteolitik aktivite göstermediği bildirilmiştir (Suzzi ve ark., 2000). Dolayısıyla, tulum peynirlerinin 4-6 °C'de olgunlaştırıldığı göz önünde bulundurulduğunda, enterokok suşları arasından *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait proteolitik enzimler Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gerçekleşen proteolizde daha etkili olabilir. Nitekim, daha önce de bahsedildiği gibi YQGPIVLNPWDQVKR peptidinin arjinin amino asidinde gerçekleşen karboksipeptidaz aktivitesinin ve LPQYLKT peptidin oluşumunda gerçekleşen Phe-Ala dipeptidaz aktivitesinin diğer laktik asit bakterilerine ek olarak sırasıyla *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 7. ve 60. günlerinden sonra α_{s2}-KN türevli peptid sayısında artış belirlenmiş olup, en fazla α_{s2}-KN türevli peptid

sayısı olgunlaşma süresinin 90. gününde tespit edilmiştir. 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli bazı peptidlerin ileri derece hidrolize olması sonucu yok olduğu ve bazı peptidlerin yeni oluştuğu gözlemlenmiştir. AIPYVRYL ve YVRYL peptidleri yalnızca olgunlaşma süresinin 7. günü belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 30. gününde FALPQYLKT, LPQYLKT ve NEINQF peptidlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerden NEINQF peptidinin ilerleyen olgunlaşma günlerinde görülmediği ve FALPQYLKT, LPQYLKT peptidlerin olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar bulunduğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin 60. gününde FALPQYLKT ve LPQYLKT peptidlerine ek olarak antihipertansif YQGPIVLNPWDQVKR peptidinin meydana geldiği tespit edilmiştir ve bu peptid olgunlaşma süresinin sonuna kadar görülmüştür. Olgunlaşma süresinin 90. gününde ise FALPQYLKT, LPQYLKT ve YQGPIVLNPWDQVKR peptidlerine ek olarak QGPIVLNPWDQVKRN ve QGPIVLNPWDQVK peptidleri meydana gelmiştir. Yeni meydana gelen bu peptidlerden QGPIVLNPWDQVKRN yalnızca olgunlaşma süresinin 90. gününde gözlemlenirken, QGPIVLNPWDQVK peptidi olgunlaşma süresinin sonunda da belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda ise yeni meydana gelen AGPFTPT peptidi ile YQGPIVLNPWDQVKR ve QGPIVLNPWDQVK peptidleri tespit edilmiştir. Daha önce belirlenen peptidlerin ilerleyen olgunlaşma günlerinde gözlemlenmemesi bu peptidlerin sütün doğal enzimlerinin veya mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle olgunlaşma süresinin 90. gününe kadar Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, olgunlaşma süresinin 30. gününü kadar ve olgunlaşma süresinin sonunda ise Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı Karaman yöresine ait tulum peynirlerinden daha düşük çıkmıştır. Yörelere bağlı olarak değişen α_{s2}-KN türevli peptid dinamiği; tulum peyniri üretiminde kullanılan süt çeşidine bağlı olarak farklı peptidlerin meydana gelmesinden ve üretimde kullanılan sütün kompozisyonuna, üretim yöntemine ve peynirlerde bulunan mikrobiyota bağlı olarak farklı proteolitik enzimlerin görev almasından kaynaklanmış olabilir.

Gagnaire ve ark. (2011) Ragusano peynirlerinde olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 4. ayında α_{s2}-KN türevli peptid sayısının 17'den 8'e düştüğünü gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) geleneksel Manchego peynirlerinin olgunlaşma süresinin 4. ayına kıyasla olgunlaşma süresinin 8. ayında α_{s2}-KN türevli peptid sayısının 1'den 8'e arttığı tespit etmişlerdir. Ereğli yöresine

ait tulum peynirlerinde de olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin 3. ayında α_{s2}-KN türevli peptid sayısının 2'den 5'e arttığı belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca peynir çeşitlerine bağlı olarak α_{s2}-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar, bazı peptidlerin yoğun düzeyde gerçekleşen proteoliz sonucu amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması ve bazı peptidlerin ise çeşitli proteolitik enzimlerle hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin oluşması ile açıklanabilir. Dolayısıyla, bu farklılıklar peynirlerdeki proteolitik sistemin özgünlüğünü yansıtmaktadır.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}-KN türevli peptid sayısı tıpkı diğer tulum peynirlerinde de olduğu gibi α_{s1}- ve β-KN türevli peptidlerin sayısı kadar artış göstermemiştir. Bu durum, α_{s2}-KN'in α_{s1}- ve β-KN'e kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerindeki mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. α_{s2}-KN'inde bulunan disülfit bağlarının proteolitik enzimlere karşı yüksek düzeyde kararlılık sağladığı bildirilmiştir (Bhat ve ark., 2016). Dolayısıyla, α_{s1}- ve β-KN'e kıyasla yalnızca α_{s2}-KN'inde bulunan disülfit bağları mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı direnç göstermiş olabilir. Ayrıca, α_{s2}-KN'inin plazmin enzimine çok duyarlı olduğu (Fox ve McSweeney, 1996) ve Katepsin D enziminin de peynirde α_{s2}-KN'nin hidrolizinde rol aldığı bildirilmiştir (Gagnaire ve ark., 2001). Plazmin aktivitesinin pH 5.0-5.2 aralığında peynirde sınırlı olduğu (Larsson ve ark., 2006) ve katepsin D enziminin optimum aktiviteyi pH 4.0'te gösterdiği (McSweeney ve ark., 1995) göz önünde bulundurulduğunda, olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin pH değerinin 4.83-5.17 arasında olmasının plazmin ve katepsin D aktivitesini sınırlandırdığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, tulum peynirlerin olgunlaşma süresi boyunca sahip olduğu su aktivitesi değerlerinin, mineral ve tuz içeriklerinin de bu enzimler üzerinde etkili olduğu öngörülmektedir (Gagnaire ve ark., 2001).

4.3.4.3. β-kazein türevli peptidler

Peynirde β-kazeinin kimozin ile hidrolizinin çok sınırlı olduğu ve genellikle sütün doğal enzimi olan plazmin aktivitesine bağlı olarak parçalandığı bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017; Taivosalo ve ark., 2018). β-kazeinin diğer kazeinlere göre oldukça hidrofobik olması sonucu moleküler arası hidrofobik etkileşimlerin kimozine duyarlı bağların kimozin tarafından erişimini engelleyebileceği bildirilmiştir (Fox ve ark., 2017). Møller ve ark. (2012) sığır kimozinin β-kazeini sınırlı ölçüde hidrolize ettiğini, bu kimozinin β-

kazeinin C terminal bölgesinde bulunan Lys (K)-Ser (S), Gln (Q)-Ser (S), Ala (A)-Phe (F) ve Leu (L)-Tyr (Y) bağlarını parçaladığını ve β-kazeinin kimozin ile hidrolizi sonucunda genellikle çok uzun zincirli peptidlerin oluştuğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından kimozin aktivitesi sonucu belirlenen β-kazein türevli peptidler arasından YQEPVLGPVRGP peptidine Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Plazmin enziminin ise çoğunlukla lizin ve arjinin amino asitlerine ait bağlarda etkili olduğu rapor edilmiştir (Bastian ve ark., 1997; McSweeney, 2004). Kimozin enziminde olduğu gibi, plazmin enziminin aktivitesi ile de çoğunlukla uzun amino asit zincirli β-kazein türevli peptidlerin oluştuğu bildirilmiştir (Dalsgaard ve ark., 2008). Plazmin enziminin β-kazeini genellikle N terminal bölgesinden hidrolize ettiği belirlenmiştir (Egito ve ark., 2003). Dolasıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-kazeinin N terminal bölgesinden belirlenen peptidler plazmin aktivitesi ile meydana gelmiş olabilir (Çizelge 4.28.).

Hurley ve ark. (2000) sütün doğal diğer bir enzimi olan katepsin D'nin de β-kazein üzerinde aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Larsen ve ark. (1996) katepsin D enziminin β-kazeini 13 farklı bölgeden hidroliz ettiğini ve bu hidroliz bölgelerin çoğunlukla β-kazeinin C terminal bölgesinde bulunan lösin, fenilalanin, triptofan ve serin amino asitlerine ait bağlardan oluştuğunu tespit etmişlerdir. Plazmin ve katepsin D gibi sütte bulunan endojen enzimlere ek olarak, peynirlerin olgunlaşma süresince ortamdaki mikrobiyotaya ait proteolitik enzimler de β-kazeinin ileri derecede hidrolizinde rol oynayabilir (Broadbent ve ark., 2002; Minervini ve ark., 2003; Sadat-Mekmene ve ark., 2013; Bounouala ve ark., 2017; Solieri ve ark., 2018). Koagülantta bulunan enzimlerin veya sütteki endojen enzimlerin aktivitesi sonucu peynirde meydana gelen uzun veya orta büyüklükteki peptidlerin mikrobiyal proteinazlar tarafından oligopeptidlere hidrolize olduğu ve oligopeptidlerin de mikrobiyal peptidazlar tarafından ileri derecede parçalandığı bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1996; Ardö ve ark., 2017).

Çizelge 4.28. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein türevli peptidler

No	Alıkonma süresi (dk)	Kütle	Protein fragmanı [a]	Kaynak	Sekans	Fonksiyonel özellik [b]	Referans	Olgunlaşma süresi (gün) [c]				
								7	30	60	90	180
1	3.546	608.3284	β-KN (62-66)	Ovine	DKIHP	ACE inhibitörü	Gómez-Ruiz ve ark. (2006)			*	*	*
2	3.849	755.4516	β-KN (109-115)	Ovine	GVPKVKE	ACE inhibitörü	Papadimitriou ve ark. (2007)	*	*	*		
3	3.850	856.5040	β-KN (109-116)	Ovine	GVPKVKET	-	-	*				
4	4.231	755.3950	β-KN (62-67)	Ovine	DKIHPF	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)	*	*	*	*	*
5	12.462	646.2787	β-KN (17-21)	Ovine	EQEEL	-	-					*
6	17.182	996.5386	β-KN (60-67)	Ovine	LQDKIHPF	-	-				*	
7	17.796	865.5007	β-KN (208-215)	Ovine	EPVLGPVR	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)					*
8	18.174	855.4332	β-KN (57-64)	Bovine	NVPGEIVE	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)			*	*	*
9	18.862	728.3979	β-KN (212-218)	Ovine	GPVRGPF	ACE inhibitörü	del Mar Contreras ve ark. (2009)					*
10	19.015	1091.6348	β-KN (181-190)	Ovine	SQPKVLPVPQ	-	-				*	*
11	19.087	1004.5389	β-KN (139-147)	Ovine	SLTLTDVEK	-	-			*		
12	19.164	1136.5793	β-KN (78-88)	Ovine	TGPIPNSLPQN	-	-	*				
13	19.243	651.3943	β-KN (185-190)	Ovine	VLPVPQ	-	-	*	*	*	*	*
14	19.392	707.4209	β-KN (95-101)	Ovine	TPVVVPP	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)				*	
15	19.548	1219.6310	β-KN (137-147)	Ovine	SQSLTLTDVEK	-	-					*
16	19.624	1132.5953	β-KN (138-147)	Ovine	QSLTLTDVEK	-	-	*	*	*	*	*
17	19.772	1156.6220	β-KN (206-215)	Ovine	YQEPVLGPVR	ACE inhibitörü, antioksidan	Rokka ve ark. (1997); Shanmugam ve ark. (2015)	*				
18	19.776	1449.7215	β-KN (135-147)	Ovine	TESQSLTLTDVEK	-	-		*	*	*	*
19	19.776	1004.5399	β-KN (139-149)	Ovine	SLTLTDVEKLH	-	-					*
20	19.927	1125.5856	β-KN (59-67)	Ovine	ELQDKIHPF	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
21	20.002	1597.7977	β-KN (121-133)	Ovine	HKEMPFPKYPVEP	DPP-4 inhibitörü, antikarsinojenik	Nongonierma ve ark. (2017a); Debruyne ve ark. (2006)	*				
22	20.157	744.3797	β-KN (77-83)	Ovine	FTGPIPN	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
23	20.462	825.4496	β-KN (212-219)	Ovine	GPVRGPFP	ACE inhibitörü	Hong ve ark. (2008)	*	*	*	*	*
24	20.536	631.3054	β-KN (52-56)	Bovine	ELEEL	-	-			*	*	*
25	20.996	575.3418	β-KN (149-153)	Ovine	HLPLP	ACE inhibitörü	Sánchez-Rivera ve ark. (2016)				*	*
26	21.300	1291.7505	β-KN (179-190)	Ovine	SLSQPKVLPVPQ	-	-	*	*	*	*	*
27	21.527	577.3097	β-KN (72-76)	Ovine	SLVYP	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)	*	*	*	*	*
28	21.829	1928.1535	β-KN (178-195)	Ovine	LSLSQPKVLPVPQKAVPQ	-	-		*			
29	21.834	1310.7004	β-KN (206-217)	Ovine	YQEPVLGPVRGP	-	-				*	*

30	22.062	1240.6059	β-KN (58-67)	Ovine	DELQDKIHPF	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)	*	*	*	*	*
31	22.592	841.4795	β-KN (211-218)	Ovine	LGPVRGPF	-	-			*	*	
32	22.820	926.4674	β-KN (110-117)	Bovine	YPFPGPIH	Opioid peptid	Sakaguchi ve ark. (2003)			*		
33	22.821	1283.6518	β-KN (77-88)	Ovine	FTGPIPNSLPQN	-	-	*				
34	22.902	523.3378	β-KN (185-189)	Ovine	VLPVP	ACE inhibitörü	Huang ve ark. (2017)				*	*
35	23.277	1163.6930	β-KN (179-189)	Ovine	SLSQPKVLPVP	-	-		*			
36	23.279	968.5165	β-KN (56-64)	Bovine	LNVPGEIVE	ACE inhibitörü	Gobbetti ve ark. (2000)					*
37	23.436	938.5344	β-KN (211-219)	Ovine	LGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)		*	*	*	*
38	23.817	940.5502	β-KN (210-218)	Ovine	VLGPVRGPF	-	-		*	*	*	*
39	23.888	1097.5608	β-KN (55-64)	Bovine	ELNVPGEIVE	-	-					*
40	24.041	1465.7370	β-KN (110-122)	Bovine	YPFPGPIHNSLPQ	Opioid peptid	Jinsmaa ve Yoshikawa (1999)		*	*	*	*
41	24.046	1744.8658	β-KN (121-134)	Ovine	HKEMPFPKYPVEPF	-	-	*	*	*	*	*
42	24.504	1037.6037	β-KN (210-219)	Ovine	VLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007); Miguel ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
43	25.260	1002.5876	β-KN (149-157)	Ovine	HLPLPLVQS	-	-				*	*
44	25.343	938.5321	β-KN (212-220)	Ovine	GPVRGPFPI	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
45	25.489	1294.7012	β-KN (207-218)	Ovine	QEPVLGPVRGPF	İmmünomodülatör	Pisanu ve ark. (2015)		*	*	*	
46	25.724	1166.6435	β-KN (208-218)	Ovine	EPVLGPVRGPF	-	-		*	*	*	*
47	25.724	1166.6435	β-KN (138-148)	Ovine	QSLTLTDVEKL	-	-		*	*	*	*
48	25.793	793.4696	β-KN (85-91)	Ovine	LPQNILP	ACE inhibitörü	Kohmura ve ark. (1990)			*	*	*
49	25.953	1134.6572	β-KN (209-219)	Ovine	PVLGPVRGPFP	-	-					*
50	26.105	1391.7557	β-KN (207-219)	Ovine	QEPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Villegas ve ark. (2014)	*	*	*	*	*
51	26.258	1263.6963	β-KN (208-219)	Ovine	EPVLGPVRGPFP	ACE inhibitörü	Hayes ve ark. (2007b)	*	*	*	*	*
52	26.326	1159.6595	β-KN (144-153)	Ovine	DVEKLHLPLP	-	-	*				
53	26.334	688.4247	β-KN (148-153)	Ovine	LHLPLP	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2007)			*	*	*
54	26.563	1457.7681	β-KN (206-218)	Ovine	YQEPVLGPVRGPF	ACE inhibitörü	Torres-Llanez ve ark. (2011)		*	*	*	*
55	26.782	1138.6186	β-KN (108-117)	Bovine	LVYPFPGPIH	ACE inhibitörü	Pihlanto ve ark. (2010)			*		
56	26.785	529.2912	β-KN (216-220)	Ovine	GPFPI	Katepsin B inhibitörü	Lee ve Lee (2000)		*	*	*	*
57	26.945	1554.8203	β-KN (206-219)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFP	-	-	*	*	*	*	*
58	27.165	1677.8900	β-KN (108-122)	Bovine	LVYPFPGPIHNSLPQ	ACE inhibitörü	Smacchi ve Gobbetti (1998)					*
59	27.391	1225.6497	β-KN (107-117)	Bovine	SLVYPFPGPIH	-	-			*		
60	27.469	656.3897	β-KN (97-102)	Ovine	VVVPPF	ACE inhibitörü	Quirós ve ark. (2009)			*	*	*
61	27.546	1764.9089	β-KN (107-122)	Bovine	SLVYPFPGPIHNSLPQ	-	-					*
62	27.708	1051.6161	β-KN (211-220)	Ovine	LGPVRGPFPI	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve ark. (2017a)	*	*	*	*	*
63	28.394	1150.6835	β-KN (210-220)	Ovine	VLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*
64	28.612	568.3572	β-KN (88-92)	Ovine	NILPL	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)					*
65	28.612	571.3348	β-KN (99-103)	Ovine	VPPFL	ACE inhibitörü	Ueno ve ark. (2004)		*	*	*	*
66	28.623	1350.6731	β-KN (124-134)	Ovine	MPFPKYPVEPF	-	-	*	*	*	*	*
67	28.689	1051.6148	β-KN (212-221)	Ovine	GPVRGPFPIL	-	-			*	*	
68	29.005	1115.6663	β-KN (148-157)	Ovine	LHLPLPLVQS	-	-		*	*	*	*

69	29.005	854.4878	β-KN (95-102)	Ovine	TPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015)		*	*	*	*
70	29.311	1504.8422	β-KN (207-220)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPI	-	-	*	*	*	*	*
71	29.540	1376.7826	β-KN (208-220)	Ovine	EPVLGPVRGPFPI	İmmünomodülatör	Kruzel (2011)	*	*	*	*	*
72	29.603	1755.9181	β-KN (73-88)	Ovine	LVYPFTGPIPNSLPQN	-	-	*				
73	29.616	1028.6381	β-KN (148-156)	Ovine	LHLPLPLVQ	-	-			*	*	*
74	29.907	1150.6846	β-KN (212-222)	Ovine	GPVRGPFPILV	-	-		*	*	*	*
75	28.915	854.4886	β-KN (86-102)	Ovine	PQNILPLTQTPVVVPPF	-	-			*		
76	28.916	1550.8474	β-KN (99-112)	Ovine	VPPFLQPEIMGVPK	-	-	*				
77	29.145	1459.8064	β-KN (78-91)	Ovine	TGPIPNSLPQNILP	-	-	*				
78	29.297	637.3479	β-KN (73-77)	Ovine	LVYPF	-	-	*				
79	29.754	724.3787	β-KN (72-77)	Ovine	SLVYPF	-	-	*				
80	29.921	551.3677	β-KN (150-154)	Ovine	LPLPL	DPP-4 inhibitörü	Nongonierma ve FitzGerald (2016)					*
81	29.997	1667.9025	β-KN (206-220)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPI	Antibakteriyal	Birkemo ve ark. (2009)	*	*	*	*	*
82	30.288	2633.4622	β-KN (93-116)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVPKVKET	-	-	*				
83	30.378	801.5112	β-KN (148-154)	Ovine	LHLPLPL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)					*
84	30.517	906.5571	β-KN (85-92)	Ovine	LPQNILPL	Antibakteriyal	Losito ve ark. (2006)			*	*	*
85	30.592	1641.8823	β-KN (73-87)	Ovine	LVYPFTGPIPNSLPQ	-	-	*				
86	30.598	2403.3642	β-KN (93-114)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-		*	*	*	*
87	30.607	1188.6615	β-KN (149-158)	Ovine	HLPLPLVQSW	ACE inhibitörü	Aslam ve ark. (2019)				*	*
88	30.683	2073.2044	β-KN (96-114)	Ovine	PVVVPPFLQPEIMGVPKVK	-	-			*	*	*
89	30.820	1449.7888	β-KN (94-106)	Ovine	QTPVVVPPFLQPE	-	-		*	*	*	*
90	30.822	30.822	β-KN (93-106)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPE	Antioksidan	Farvin ve ark. (2010)	*	*	*	*	*
91	30.835	1550.8328	β-KN (93-102)	Ovine	TQTPVVVPPF	Antioksidan	Vavrusova ve ark. (2015); Stanton ve ark. (2005)	*	*	*	*	*
92	30.898	1606.8787	β-KN (77-91)	Ovine	FTGPIPNSLPQNILP	-	-					*
93	30.903	1324.7397	β-KN (93-104)	Ovine	TQTPVVVPPFLQ	-	-		*	*	*	*
94	30.988	1324.7377	β-KN (93-107)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEI	-	-					*
95	31.050	1321.7284	β-KN (95-106)	Ovine	TPVVVPPFLQPE	Antienflamatuar ve antioksidan	Bamdad ve ark. (2017)		*	*	*	*
96	31.217	1220.6798	β-KN (96-106)	Ovine	PVVVPPFLQPE	Antibakteriyal	Almaas ve ark. (2011)			*	*	*
97	31.353	1129.6839	β-KN (183-192)	Bovine	LHLPLPLLQS	Antibakteriyal ve antioksidan	Rana ve ark. (2018)			*		
98	31.355	1263.7745	β-KN (210-221)	Ovine	VLGPVRGPFPIL	-	-	*	*	*	*	*
99	31.598	1421.7971	β-KN (93-105)	Ovine	TQTPVVVPPFLQP	-	-	*	*	*	*	*
100	31.659	1169.6192	β-KN (99-108)	Ovine	VPPFLQPEIM	-	-	*				
101	31.674	1320.7457	β-KN (94-105)	Ovine	QTPVVVPPFLQP	-	-		*	*	*	*
102	31.888	1617.9305	β-KN (207-221)	Ovine	QEPVLGPVRGPFPIL	-	-		*	*	*	*
103	31.903	1192.6807	β-KN (95-105)	Ovine	TPVVVPPFLQP	ACE inhibitörü	Abubakar ve ark. (1998)			*	*	*

104	32.132	1091.6317	β-KN (96-105)	Ovine	PVVVPPFLQP	-	-					*
105	32.193	1489.8699	β-KN (208-221)	Ovine	EPVLGPVRGPFPIL	ACE inhibitörü	Miguel ve ark. (2006)	*	*	*	*	*
106	32.351	2176.2012	β-KN (93-112)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIMGVPK	-	-				*	
107	32.498	1780.9910	β-KN (206-221)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPIL	Hiperkolesterolemi önleyici, antioksidan	Mahdi ve ark. (2017); Mahdi ve ark. (2018)	*	*	*	*	*
108	32.878	1268.6790	β-KN (98-108)	Ovine	VVPPFLQPEIM	-	-	*				
109	32.961	1196.6801	β-KN (93-103)	Ovine	TQTPVVVPPFL	-	-		*	*	*	
110	33.107	1880.0574	β-KN (206-222)	Ovine	YQEPVLGPVRGPFPILV	ACE inhibitörü	Bounouala ve ark. (2017)	*	*	*	*	*
111	33.276	1301.7522	β-KN (148-158)	Ovine	LHLPLPLVQSW	-	-	*	*	*	*	*
112	33.582	1663.9184	β-KN (93-107)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEI	-	-		*	*	*	*
113	33.793	2085.1418	β-KN (123-141)	Bovine	NIPPLTQTPVVVPPFLQPE	Beyin fonksiyonunu güçlendirici	Ohsawa ve ark. (2018a)					*
114	34.344	1777.0011	β-KN (92-107)	Ovine	LTQTPVVVPPFLQPEI	-	-					*
115	34.403	664.4515	β-KN (185-190)	Bovine	LPLPLL	ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü	Lin ve ark. (2017); Nongonierma ve FitzGerald (2016)		*	*	*	*
116	34.420	1519.9007	β-KN (89-102)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPF	-	-	*	*	*	*	*
117	34.555	1956.1087	β-KN (123-140)	Bovine	NIPPLTQTPVVVPPFLQP	Beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik	Ohsawa ve ark. (2013)					*
118	34.629	1794.9511	β-KN (93-108)	Ovine	TQTPVVVPPFLQPEIM	ACE inhibitörü	Pisanu ve ark. (2015)	*	*	*		
119	35.090	1565.8570	β-KN (95-108)	Ovine	TPVVVPPFLQPEIM	-	-	*	*			
120	35.164	1987.1335	β-KN (89-106)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPE	-	-				*	*
121	35.944	1858.0887	β-KN (89-105)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQP	-	-				*	*
122	36.307	1616.9502	β-KN (124-138)	Bovine	IPPLTQTPVVVPPFL	-	-			*	*	*
123	36.619	2100.2246	β-KN (89-107)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEI	-	-				*	
124	36.764	1632.9890	β-KN (89-103)	Ovine	LPLTQTPVVVPPFL	-	-	*				
125	36.918	2231.2648	β-KN (89-108)	Ovine	ILPLTQTPVVVPPFLQPEIM	-	-	*				
Toplam								**50**	**57**	**74**	**78**	**89**

[a] Protein sekansları (NCBI Accession IDs: XP_010804480, XP_005681778, CAA34502). KN: kazein.

[b] ACE inhibitörü: tansiyon düşürücü, DPP-4 inhibitörü: dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, Opioid: Uyuşturucu, sakinleştirici, İmmünnomodülatör: bağışıklık sistemini düzenleyici, Antiamnezik: unutkanlık önleyici, Katepsin B: patolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır, Antienflamatuar: iltihap oluşumunu önleyici, Antikarsinojenik: kanser önleyici, Hiperkolesterolomi önleyici: kolesterol düşürücü.

[c] Yıldız işareti tanımlanan peptidlerin ilgili olgunlaşma gününde bulunduğunu ifade etmektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile tanımlanan β-kazein (KN) türevli peptidler Çizelge 4.28.'de sunulmaktadır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam 125 çeşit β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu değer, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}- (88 çeşit) ve α_{s2}-KN (9 çeşit) türevli peptidlerin sayısından oldukça yüksektir. Ayrıca, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla en fazla β-KN türevli çeşidi Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Bu farklılığın, peynirlerdeki proteolitik sistem aktivitesinin yörelere göre değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Proteolitik sistem aktivitesindeki farklılıklara peynir üretiminde kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonu, koagülant çeşidi ve miktarı, üretim tekniği ve olgunlaşma süresince peynirde bulunan mikrobiyota ile ilgili farklılıklar neden olmuş olabilir.

Gómez-Ruiz ve ark. (2004) rennet, *Lc. lactis* subsp. *lactis* (%80) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%20) starter kültürleri kullanılarak pastörize koyun sütünden üretilen Manchego peynirinin 8 ay olgunlaştırılması boyunca 17 çeşit β-KN türevli peptid belirlemişlerdir. Gagnaire ve ark. (2001) fungal kaynaklı (*Cryphonectria parasitica*) koagülant ve termofilik laktik asit bakterileri (streptokok ve laktobasil) ve propiyonik asit bakterilerinden oluşan starterler kullanılarak termize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinin 50 gün olgunlaşma süresi boyunca toplam 28 çeşit β-KN türevli peptid tanımlamışlardır. Bu çalışmaya ek olarak, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik asit bakterileri kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinin 41 gün olgunlaşma süresince 215 çeşit β-KN türevli peptid tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar incelendiğinde, kullanılan koagülant türünün, süt türünün ve starter kültür çeşidinin β-KN türevli peptid sayısını etkilediği görülmektedir. Ayrıca, çiğ inek sütünden üretilen geleneksel Coalho peynirlerinde 74 çeşit (Fontenele ve ark., 2017) ve çiğ koyun sütü kullanılarak üretilen Idiazabal peynirlerinin 4 ay olgunlaştırılması boyunca 65 çeşit (Sagardia ve ark., 2013) β-KN türevli tanımlamıştır.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin 6 ay olgunlaşma süresince belirlenen β-KN türevli peptid sayısı Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2004), Coalho (Fontenele ve ark., 2017) ve Idiazabal (Sagardia ve ark., 2013) peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısından daha yüksek bulunmuştur. Peynir üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda β-KN türevli peptid sayısında veya çeşidinde gözlemlenen farklıkların genellikle üretimde kullanılan süt türüne, sütte bulunan doğal enzimlerin aktivitesine, süte ısıl işlem

uygulanıp uygulanmamasına, koagülant miktarına ve çeşidine, starter kültür kullanılıp kullanılmamasına ve olgunlaşma süresince farklı mikrobiyal enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Peynir üretiminde süte uygulanan pastörizasyon işleminin β-KN türevli peptid sayısını azalttığı (Pisanu ve ark., 2015) ve farklı süt çeşitlerinin kullanılması ile farklı β-KN türevli peptidlerin oluştuğu (Losito ve ark., 2006) bildirilmiştir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidler, üretim metodundaki karakteristiklere bağlı olarak bu tulum peynirinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olabilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ELQDKIHPF, MPFPKYPVEPF, YPFPGPIHNSLPQ, LVYPFPGPIHNSLPQ, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPF, YQEPVLGPVR, QEPVLGPVRGPFP ve EPVLGPVRGPFPI peptidleri Coalho peynirlerinde de gözlemlenmiştir (Fontenele ve ark., 2017). Caprino del Piemonte peynirinde belirlenen NILPL, LHLPLP ve GPVRGPFPI peptidlerine (Losito ve ark., 2006) ve 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde belirlenen DKIHPF, DKIHP, SLSQPKVLPVPQ, LPQNILP, LPLPL ve VLGPVRGPFP ve GPVRGPFPI peptidlerine de (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli DKIHPF, LQDKIHPF, DELQDKIHPF, YPFPGPIH, SLVYPFPGPIHNSLPQ, LVYPFPGPIHNSLPQ, YPFPGPIHNSLPQ, TPVVVPP, TPVVVPPF, IPPLTQTPVVVPPFL, TPVVVPPFLQP, TPVVVPPFLQPE, HKEMPFPKYPVEPF, MPFPKYPVEPF, LPLPLL, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVR ve GPVRGPFPI peptidleri sıvı buzağı renneti ve starter kültür olarak *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik asit bakterileri kullanılarak üretilen Emmental peynirlerinin 41 gün olgunlaşma süresince de tanımlanmıştır (Sadat-Mekmene ve ark., 2013). Bu peptidlerin birçoğunun karboksipeptidaz ve aminopeptidaz aktivitesine bağlı olarak meydana geldiği görülmektedir. Bununla birlikte, Idiazabal peynirleri ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli YQEPVLGPVRGPFPILV, YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGP, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPF, EPVLGPVR, PVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, LGPVRGPFPIL, GPVRGPFPILV, GPVRGPFPIL, GPVRGPFPI, GPVRGPFP ve SLSQPKVLPVPQ peptidleri ortak bulunmuştur (Sagardia ve ark., 2013).

β-KN'in C terminalinden gelen bu peptidlerin de genellikle karboksipeptidaz ve aminopeptidaz aktivitesi ile oluştuğu görülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerindeki β-KN türevli peptidlere en fazla benzeyen peptidler Idiazabal ve Emmental peynirlerinde gibi gözükse de aslında bu tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin büyük bir çoğunluğu (yaklaşık %81'i) Idiazabal ve Emmental peynirlerde tanımlanan β-KN türevli peptidlerden farklı bulunmuştur. Bu durum da Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin β-KN türevli peptid dinamiği açısından özgünlüğünü yansıtmaktadır.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (60) β-KN'in hidrofobik olan C terminal bölgesinin hidrolizi ile meydana geldiği ve bunu sırasıyla β-KN'in orta bölgesinden (46) ve N terminal bölgesinden (19) gelen peptidlerin takip ettiği belirlenmiştir. Diğer yörelere ait tulum peynirleri ile benzer şekilde, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s1}-KN'in N terminal bölgesinden meydana geldiği belirlenirken, α_{s2}-KN türevli peptidlerin ise çoğunlukla α_{s2}-KN'in orta ve C terminal bölgelerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerine kıyasla Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde β-KN'in orta bölgesinden çok daha fazla peptid meydana gelmiştir. Dolayısıyla, Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinden daha yüksek olmasına bu bölgeden gelen peptidlerin katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Plazmin enziminin β-KN'i genellikle N terminal bölgesinden hidrolize ettiği göz önünde bulundurulduğunda (Egito ve ark., 2003), Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal bölgesinden meydana gelen peptidler plazmin enziminin aktivitesi sonucu meydana gelmiş olabilir. Sütteki endojen diğer bir enzimi olan katepsin D'nin ise β-KN'in çoğunlukla C terminal bölgesini hidrolize ettiği düşünüldüğünde (Larsen ve ark., 1996), Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelen peptidler katepsin D enziminin aktivitesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerinden peptidlerin oluşumunda mikrobiyal proteolitik enzimler de rol almış olabilir. Lozo ve ark. (2011) laktobasillerde tanımlanan proteinazların özellikle β-KN'in C terminal bölgesini hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. β-KN'in N terminal bölgesinin ise mikrobiyal proteolitik enzimlere karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Sadat-Mekmene ve ark., 2011; Miclo ve ark., 2012; Chang ve ark., 2013). Bununla birlikte, çeşitli laktik asit bakterilerine ait proteolitik enzimlerin β-KN'in N terminal, orta ve C terminal bölgelerini içeren çok

çeşitli bölgeleri hidrolize ettiği bildirilmiştir (Taivosalo ve ark., 2018). Buna bağlı olarak, β-KN'in orta bölgesinden meydana gelen peptid sayısının yörelere göre farklılık göstermesinin tulum peynirlerinde bulunan mikrobiyotanın ve dolayısıyla mikrobiyal proteolitik enzimlerin farklılığından kaynaklandığı öngörülmektedir.

β-KN türevli peptidlerin çeşitli peynirlerde, farklı parçalanma bölgelerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Coalho (Fontenele ve ark., 2017), Idiazabal (Sagardia ve ark., 2013), ve keçi peynirlerinde (Sommerer ve ark., 2001) β-KN'in daha çok C terminal bölgesinden meydana gelen peptidlerin bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu peynirlerin yanı sıra, Manchego (Gómez-Ruiz ve ark., 2007), Emmental (Gagnaire ve ark., 2001; Sadat-Mekmene ve ark., 2013),Ragusano (Gagnaire ve ark., 2011) ve Old Saare (Taivosalo ve ark., 2018) peynirlerinde ise β-KN'in orta ve C terminal bölgelerine kıyasla N terminal bölgesinden daha yüksek sayıda β-KN türevli peptidin meydana geldiği belirlenmiştir. Peynir çeşitlerine bağlı olarak meydana gelen β-KN türevli peptid modellerinde gözlemlenen bu farklılıklar aktif proteolitik sistemin farklılığını yansıtmaktadır.

β-KN'in hidrofilik ilk 21 amino asit R gruplarını takip bölgenin hidrofobik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Swaisgood, 2003). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde, hidrofilik bölgeden gelen β-KN (17-21) dışındaki tüm β-KN türevli peptidler hidrofobik bölgeden meydana gelmiştir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN'in de çoğunlukla hidrofobik bölgelerinden parçalandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, α_{s1}- ve β-KN'deki hidrofilik bölgelerin peynirde mevcut proteolitik enzimlere karşı hidrofobik bölgelere kıyasla daha dirençli olduğunu ortaya koymaktadır. Hidrofobik bölgeden meydana gelen β-KN türevli peptidlerin 52-222 amino asitleri arasında bulunduğu görülmüştür. Miclo ve ark. (2012) tarafından β-KN'in 57-209 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *S. thermophilus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara ve Sadat-Mekmene ve ark. (2011) tarafından β-KN'in 28-207 amino asitleri arasındaki hidrofobik bölgenin *L. helveticus*'a ait hücre duvarı ilişkili proteinazlara karşı hidrofilik bölgelere kıyasla daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda, mikrobiyal proteolitik enzimlerin β-KN'in daha çok hidrofobik bölgeleri üzerinde aktivite gösterdiği görülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca tanımlanan β-KN türevli peptidlerin 5-24 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha uzun olduğu tespit edilirken, diğer taraftan β-KN türevli peptidlerin uzunluğunun α_{s1}-KN türevli

peptidlere yakın olduğu belirlenmiştir. Ancak, α_{s1}-KN türevli peptidlere kıyasla daha fazla sayıda β-KN türevli uzun peptid gözlemlenmiştir. Bu durumun, peynirdeki proteolitik enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN'ler üzerindeki aktivitelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde uzun peptidlerin, genellikle β-KN'in orta bölgesinden geldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kısa zincirli peptidlerin ise β-KN'in tüm bölgelerinden meydana geldiği gözlemlenmiştir. 8 ay olgunlaştırılan Old Saare peynirlerinde 4-25 (Taivosalo ve ark., 2018), Coalho peynirlerinde 7-26 (Fontenele ve ark., 2017), 4 ay olgunlaştırılan Idiazabal peynirlerinde 7-17 (Sagardia ve ark., 2013), 7 ay olgunlaştırılan Ragusano peynirinde 9-24 (Gagnaire ve ark., 2011), 8 ay olgunlaştırılan Manchego peynirlerinde 5-12 (Gómez-Ruiz ve ark., 2004) ve 50 gün olgunlaştırılan Emmental peynirlerinde 3-20 (Gagnaire ve ark., 2001) amino asit uzunluğuna sahip β-KN türevli peptidlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptidlerde undekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu ve bunu dekapeptidlerin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca, bu peptidlerden sonra pentapeptidlerin, oktapeptidlerin ve tetradekapeptidlerin de yüksek sayıda bulunduğu tespit edilmiştir. 17-24 amino asit uzunluğuna sahip β-KN türevli peptidlerin sayısının ise oldukça az olduğu belirlenmiştir.

β-KN'in hidrolizi ile antibakteriyal özellikli kazesidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI) ve kazesidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV-sığır, YQEPVLGPVRGPFPILV-koyun ve keçi) peptidlerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009). β-KN türevli kazesidin 15 ve 17 peptidlerine 180 günlük olgunlaşma süresince Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, bu kazesidin peptidlerinin hidroliz ürünü olan 28 peptidin daha bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidler; YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPF, YQEPVLGPVRGP, YQEPVLGPVR, QEPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPF, EPVLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPF, EPVLGPVR, PVLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPIL, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, VLGPVRGPF, LGPVRGPFPI, LGPVRGPFP, LGPVRGPF, GPVRGPFPILV, GPVRGPFPIL, GPVRGPFPI, GPVRGPFP, GPVRGPF ve GPFPI sekanslarından oluşmaktadır. Kazesidinlerin parçalanma ürünleri olan bu peptidlerin aminopeptidaz, karboksipeptidaz, dipeptidaz (Glu-Pro/EP, Gly-Pro/GP), tripeptidaz (Gly-Pro-Phe/GPF) ve endopeptidaz aktivitelerine bağlı olarak meydana geldiği görülmektedir. GPFPI peptidinin oluşumunda endopeptidaz aktivitesi, EPVLGPVRGPFPIL peptidinden VLGPVRGPFPIL peptidinin oluşumunda

EP dipeptidaz aktivitesi, YQEPVLGPVRGPFP peptidinden YQEPVLGPVR peptidinin oluşumunda GP dipeptidaz aktivitesi ve EPVLGPVRGPF peptidinden LGPVRGPF peptidinin oluşumunda EPV tripeptidaz aktivitesi gerçekleşmiştir. Diğer kazesidin türevli peptidler ise aminopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitesi sonucu oluşmuştur. Bu enzimlerin, peynirlerde bulunan mikrobiyotaya ait enzimler olduğu düşünülmektedir. Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla kazesidin türevli peptid sayısı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde daha fazla bulunmuştur. Yöreler arasında gözlemlenen bu farklılığın peynir mikrobiyotasındaki farklılıklardan kaynaklandığı öngörülmektedir. Demirci (2019) Anamur, Mut ve Karaman yörelerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde mikrobiyal çeşitliliğin daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Meisel ve Bockelmann (1999) tarafından çeşitli mikrobiyal hücre duvarı ilişkili proteinazlar ile β-KN'in parçalanması sonucu antihipertansif beta kazokinin 7 (AVPYPQR) ve 10 (YQQPVLGPVR) peptidlerinin meydana geldiği bildirilmiştir. Ancak, β-KN türevli bu peptidlere Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmamıştır. Ayrıca, β-KN'in hidrolizi ile opioid özellikli β-kazomorfin 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 13 gibi β-kazomorfinlerin oluştuğu rapor edilmiştir (Jinsmaa ve Yoshikawa, 1999; Nguyen ve ark., 2015). Bu opioid peptidler arasından β-kazomorfin 7'nin (YPFPGPI) tip I diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırması nedeniyle insan hastalıklarının gelişiminde bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Nguyen ve ark., 2015). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde bu opioid peptidlerden β-kazomorfin 8 (YPFPGPIH) ve β-kazomorfin 13 (YPFPGPIHNSLPQ) peptidleri tespit edilmiştir ve bu tulum peynirlerinin β-kazomorfin 7 bakımından sağlık riski taşımadığı belirlenmiştir.

Demirci (2019) Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca *E. faecium* suşlarının baskın olduğunu belirlemiştir ve bu olgunlaşma süresince peynirlerde *E. hirae, E. durans, E. faecalis, L. helveticus, L. plantarum, L. rhamnosus, L. brevis, Lc. lactis, Leu. mesenteroides* ve *S. thermophilus* suşlarının da bulunduğunu tespit etmiştir. Bu mikrobiyotaya ait hücre içi ve hücre dışı enzimlerin Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN'in türevli peptidlerin oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çizelge 4.28. incelendiğinde, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilen çoğu β-KN türevli peptidin karboksipeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz, tripeptidaz ve endopeptidaz aktivitesi sonucu meydana geldiği görülmektedir. Bu enzimlerin, tulum peynirin mikrobiyotasından kaynaklandığı öngörülmektedir. Demirci (2019) Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinden farklı

olarak Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde *L. rhamnosus, L. helveticus* ve *Leu. mesenteroides* suşlarının bulunduğunu gözlemlemiştir. Dolayısıyla, bu farklı mikrobiyotaya sahip proteolitik enzimler diğer yörelere ait tulum peynirlerine kıyasla Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde farklı çeşitlilikte β-KN'in türevli peptidlerin meydana gelmesine neden olmuş olabilir.

Solieri ve ark. (2018) tarafından Parmigiano Reggiano peynirinden izole edilen *L. rhamnosus* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}- ve α_{s2}-KN'lere kıyasla daha çok β-KN üzerinde etkili olduğunu ve bu enzimlerin hidrofobik veya negatif yüklü amino asitlerin bulunduğu bağları parçalamayı tercih ettiği bildirilmiştir. Bu araştırmacıların, *L. rhamnosus* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesi ile belirledikleri β-KN türevli LNVPGEIVE, DKIHPF, LHLPLPLVQSW, LHLPLPLLQS, LHLPLPL, LHLPLP, TQTPVVVPPFLQ, TQTPVVVPPF, YQEPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFP, HKEMPFPKYPVEPF, HKEMPFPKYPVEP ve MPFPKYPVEPF peptidlerine Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, *L. rhamnosus C6 suşu* ile fermente edilen sütlerde tanımlanan β-KN türevli LHLPLPLLQS, YQEPVLGPVRGPFPI, FVAPFPEVFGKE, FVAPFPEVFGK ve FVAPFPEVFG peptidleri de Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir (Rana ve ark., 2018).

Fan ve ark. (2019) *L. helveticus* CICC6024 suşuna ait hem hücre içi hem de hücre dışı enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-KN'lere kıyasla daha β-KN'i hidrolize ettiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıların, *L. helveticus* CICC6024 suşuna ait proteolitik enzimlerin aktivitesi ile belirledikleri DELQDKIHPF, ELQDKIHPF, YPFPGPIHNSLPQ, VPPFL, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVR, GPVRGPFPI, QEPVLGPVRGPFP ve EPVLGPVRGPFP peptidlerine Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de tanımlanmıştır. Jensen ve ark. (2009) *L. helveticus* suşlarına ait proteolitik enzimlerin α_{s1}-KN'i N terminal bölgesinden ve β-KN'i C terminal bölgesinden hidrolize ettiğini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından *L. helveticus* suşlarına ait proteolitik enzimlerin aktivitesi sonucu gözlemlenen ELEEL peptidi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen NIPPLTQTPVVVPPFLQPE peptidinin oluşumunda *L. helveticus*'un sorumlu olduğu bildirilmiştir (Ohsawa ve ark., 2018b).

Fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}- ve α_{s2}-KN'lere kıyasla özellikle β-KN üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Miclo ve ark., 2012). Bu araştırmacılar tarafından *S. thermophilus* suşlarına ait hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesi sonucu belirlenen β-KN türevli

HKEMPFPKYPVEPF, LPLPL, VLPVPQ, YQEOVLGPVR, YQEOVLGPVRGPFP ve GPVRGPFP peptidlerine Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de rastlanmıştır. Ayrıca, Chang ve ark. (2014) tarafından yoğurttan izole edilen *S. thermophilus* 4F44 suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesi ile belirlenen β-KN türevli LHLPLPLLQS peptidi ve Moreno-Montoro ve ark. (2018) tarafından *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ve *L. plantarum* ile fermente edilen keçi sütlerinde belirlenen β-KN türevli YQEPVLGPVRGPFPIL peptidi de Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir.

Geleneksel İspanyol keçi peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* suşlarının hücre duvarı ilişkili proteinaz aktivitesinin α_{s1}-KN'e kıyasla daha çok β-KN üzerinde gerçekleştiği ve *Lc. lactis* suşlarının proteinaz aktivitesinin *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Requena ve ark., 1993). Bu araştırmacılar ilgili suşlar arasında en yüksek dipeptidaz aktivitesini ise *L. plantarum* suşlarında belirlemişlerdir. Bounouala ve ark. (2017) tarafından *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi sonucu belirlenen β-KN türevli SLVYPF, FTGPIPN, LHLPLPL, YQEPVLGPVRGPFPILV, EPVLGPVR ve TPVVVPPF peptidleri ile *L. brevis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesi sonucu belirlenen β-KN türevli TQTPVVVPPF, VVVPPF, FTGPIPN ve LHLPLPL peptidleri Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de gözlemlenmiştir.

Feta peynirinden izole edilen *E. durans* suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteinazların α_{s1}-KN'e kıyasla β-KN'i daha hızlı hidrolize ettiği bildirilmiştir (Igoumenidou ve ark., 2005). *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre dışı proteinazların ise β-KN üzerinde çok yüksek veya orta derecede aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Veljovic ve ark., 2009). Bununla birlikte, Quirós ve ark. (2007) ve Gútiez ve ark. (2013) *E. faecalis* suşları ile fermente edilen sütlerde β-KN türevli VLGPVRGPFP, VVVPPF, LHLPLPL ve LHLPLP peptidlerinin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bu peptidler de Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir.

L. helveticus, L. rhamnosus, Lc. lactis, S. thermophilus, E. durans, E. faecium ve *E. faecalis* ile gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde (Requena ve ark., 1993; Igoumenidou ve ark., 2005; Veljovic ve ark., 2009; Miclo ve ark., 2012; Solieri ve ark., 2018; Fan ve ark., 2019), genellikle bu mikroorganizmalara ait proteolitik enzimlerin α_{s1}- ve α_{s2}-KN'lere kıyasla daha çok β-KN üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Bu mikroorganizmaların Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de bulunduğu bildirilmiştir (Demirci, 2019). Dolayısıyla, bu durum Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}- ve

α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha fazla β-KN türevli peptidlerin bulunmasını açıklamaktadır.

Theriot ve ark. (2009) bir dipeptidaz olan mikrobiyal prolidazların sonunda prolin bulunan dipeptidleri hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Christensen ve ark. (1999) *Lc. lactis* ve *L. helveticus* suşlarının da prolidaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde bu suşlara ait prolidaz enzimlerinin EPVLGPVRGPFPIL peptidinin EP dipeptidi üzerindeki aktivitesine bağlı olarak beta kazesidin türevli VLGPVRGPFPIL peptidi ve YQEPVLGPVRGP peptidinin GP dipeptidi üzerindeki aktivitesine bağlı olarak beta kazesidin türevli YQEPVLGPVR peptidi meydana gelmiş olabilir. Ayrıca, *Leu. mesenteroides* suşlarının Ser-Leu (SL) dipeptidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (El-Shafei ve ark., 1990). Dolayısıyla, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde SL üzerinde dipeptidaz aktivitesine bağlı olarak SLSQPKVLPVPQ peptidinden SQPKVLPVPQ peptidinin meydana gelmesi *Leu. mesenteroides* suşlarından kaynaklanmış olabilir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde kazesidin türevli GPVRGPFPI peptidinden GPFPI peptidinin oluşumunda arjinin ve glisin amino asitleri arasında endopeptidaz aktivitesinin gerçekleştiği görülmüştür. Bu durum, arjinin bağlarında endopeptidaz aktivitesi gösteren *Leu. mesenteroides, Lc. lactis* ve *E. faecium* suşlarına ait proteolitik enzimlerden kaynaklanmış olabilir (Macedo ve ark., 2000).

S. thermophilus suşlarında aminopeptidaz (PepA, PepC, PepM, PepN ve Pep S), prolinaz (PepP, PepQ ve PepX), dipeptidaz (PepV, PepXP), tripeptidaz (PepT) ve endopeptidaz (PepO) genlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Somkuti ve Paul, 2010). PepA aminopeptidazının amino ucunda bulunan aspartik asit (D) ve glutamik asit (E) gibi asidik amino asitleri, PepC aminopeptidazının amino ucunda bulunan arjinin (R), histidin (H), lizin (K), glutamik asit (E), aspartik asit (D), alanin (A), lösin (L) ve fenilalanin (F) amino asitlerini, PepM aminopeptidazının amino ucunda bulunan metiyonin (M) amino asidini, PepN aminopeptidazının amino ucunda bulunan özellikle bazik lizin (K) ve arjinin (R) ile hidrofobik/yüksüz lösin (L) ve alanin (A) amino asitlerini ve PepS aminopeptidazının amino ucunda bulunan arjinin (R) amino asidini veya fenilalanin (F), triptofan (W) ve tirozin (Y) gibi aromatik amino asitleri hidrolize ettiği bildirilmiştir (Christensen ve ark., 1999; Thomas ve ark., 2010).

L. helveticus CNRZ32 suşuna ait PepC aminopeptidazının N terminal ucunda arjinin ve lizin gibi bazik amino asitleri ve prolin, metiyonin, lösin , fenilalanin amino asitlerini içeren dipeptidleri, tripeptidleri veya bu amino asitleri hidrolize ettiği

bildirilmiştir (de Palencia ve ark., 2000). Ayrıca, *L. rhamnosus*'un da PepN aminopeptidazına sahip olduğu bildirilmiştir (Christensen ve ark., 1999). *Leu. mesenteroides* suşlarının ise lizin, lösin, fenilalanin, alanin, prolin, glutamik asit ve glisin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (El-Shafei ve ark., 1990). İspanyol Armada peynirinden izole edilen *L. plantarum* ve *L. brevis* suşlarına ait proteolitik enzimlerin alanin, lizin ve lösin bağları üzerinde yüksek düzeyde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Herreros ve ark., 2003). Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis* ve *Leu. mesenteroides* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin ise alanin, arjinin, lösin, lizin ve metiyonin amino asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenirken, *E. faecium* suşuna ait hücre içi proteolitik enzimlerin ise arjinin ve metiyonin asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Macedo ve ark., 2000). Yapılan diğer bir çalışmada ise, İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin lizin, lösin, alanin ve prolin bağları üzerinde aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (González ve ark., 2010). Bu çalışmalara ek olarak, Pecorino Abruzzese peynirinden izole edilen *E. durans* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına ait hücre içi enzimlere kıyasla arjinin ve lizin amino asitlerine ait bağlar üzerinde daha yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Serio ve ark., 2010).

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda aspartik asit (D), glutamik asit (E), lösin (L), valin (V), glutamin (Q), tirozin (Y), serin (S), treonin (T), fenilalanin (F) ve prolin (P) amino asitlerine ait bağlarda aminopeptidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsedilen aminopeptidaz aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen *L. helveticus, L. rhamnosus, Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis, S. thermophilus, Leu. mesenteroides, E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarına (Demirci, 2019) ait proteolitik enzimler bu tulum peynirlerinde β-KN türevli peptidlerin oluşumunda gözlemlenen aminopeptidaz aktivitelerinden sorumlu olabilir.

Serra da Estrela peynirinden izole edilen *Lc. lactis, Leu. mesenteroides* ve *E. faecium* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin arjinin ve fenilalanin bağlarında karboksipeptidaz aktivitesine sahip olduğu ve bu suşlar arasında en yüksek karboksipeptidaz aktivitesini *E. faecium* suşunun gösterdiği tespit edilmiştir (Macedo ve ark., 2000). İspanyol Armada peynirinden izole edilen *Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis* ve *Leu. mesenteroides* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerinin ise C terminalinde

bulunan lösin amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği ve bu suşlar arasından en yüksek karboksipeptidaz aktivitesinin *Lc. lactis* suşlarında olduğu belirlenmiştir (Herreros ve ark., 2003). Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise, İspanyol Genestoso peynirlerinden izole edilen *Lc. lactis* GE 2379 ve *E. faecalis* GE 2320 suşlarının *Leu. mesenteroides* ve *L. plantarum* suşlarına kıyasla C terminalinde bulunan lösin amino asidine karşı daha yüksek karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir (González ve ark., 2010). Aynı araştırmacılar, *Lc. lactis* GE 2363 suşunun *L. plantarum, Leu. mesenteroides* ve *E. faecalis* suşlarına kıyasla daha yüksek dipeptidaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. *S. thermophilus* LMD-9 suşuna ait hücre dışı proteolitik enzimlerin arjinin ve lizin amino asitlerine ait bağlarda karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Hafeez ve ark., 2015). Ayrıca, *S. thermophilus* suşlarına ait hücre içi proteolitik enzimlerin C terminalinde bulunan lösin ve asparajin amino asitlerine ait bağlar üzerinde karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Deutsch ve ark., 2000). Bu çalışmalara ek olarak, *E. hirae* ATCC 9790 suşuna ait hücre duvarı ilişkili proteolitik enzimlerin C terminalinde bulunan alanin amino asidine karşı karboksipeptidaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Kariyama ve ark., 1990).

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde bazı β-KN türevli peptidlerin oluşumunda C terminal bölgesinde bulunan fenilalanin (F), prolin (P), lösin (L), izolösin (I), metiyonin (M), asparajin (N), glutamik asit (E), treonin (T), valin (V) ve glutamin (Q) amino asitlerine ait bağlarda karboksipeptidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsedilen karboksipeptidaz aktivitesi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen *Leu. mesenteroides, Lc. lactis, L. plantarum, L. brevis, S. thermophilus, E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarına (Demirci, 2019) ait proteolitik enzimler bu tulum peynirlerinde β-KN türevli peptidlerin oluşumunda lösin, fenilalanin ve asparajin amino asitlerine ait bağlarda gözlemlenen karboksipeptidaz aktivitelerinden sorumlu olabilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak gerçekleşen proteolize bağlı olarak önemli ölçüde artış göstermiştir. β-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında 50 β-KN türevli peptid belirlenirken, 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda ise 89 β-KN türevli peptid tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda β-KN türevli peptid sayısında artış en fazla Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenirken, bunu sırasıyla Karaman, Ereğli ve Anamur yöresine ait tulum peynirler

takip etmiştir. Yöreler arasında en fazla β-KN türevli peptid çeşitliliği Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde görülmesine rağmen, olgunlaşma süresi boyunca β-KN türevli peptid sayısındaki artışın Mut yöresine ait tulum peynirlerinde daha yüksek olmasının bu yöreye kıyasla Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında çok daha yüksek miktarda β-KN türevli peptidin meydana gelmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum, tulum peynirlerindeki proteolitik sistem aktivitesinin yörelere göre değiştiğini göstermektedir.

Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) Manchego peynirlerinde 8 aylık olgunlaşma süresine bağlı olarak peptid sayısında artış belirlemişlerdir. Sadat-Mekmene ve ark. (2013) ise sıvı buzağı renneti ve *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik starter bakteriler kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 13. gününe kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 40. gününde azaldığını bildirmişlerdir, ancak, olgunlaşma süresinin 40. günündeki peptid sayısı olgunlaşma süresinin başından yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Taivosalo ve ark. (2018) mikrobiyal rennet ve starter kültürler (mezofilik ve termofilik) kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Old Saare peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 3. ayına kadar arttıktan sonra olgunlaşma süresinin 8. ayına kadar azaldığını, ancak, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda daha yüksek miktarda β-KN türevli peptid bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan, Gagnaire ve ark. (2011) pıhtısı haşlanan Ragusano peynirinde 7 aylık olgunlaşma süresi ile birlikte β-KN türevli peptid sayısının azaldığını belirlemişlerdir. Peynir çeşitlerine bağlı olarak β-KN türevli peptid sayısında gözlemlenen bu farklılıklar olgunlaşma süresi boyunca bazı peptidlerin peynirde birikmesi, bazı peptidlerin hidrolize olması sonucu yeni peptidlerin oluşması ve bazılarının ise amino asitlere kadar ileri derecede hidrolize olması ile açıklanabilir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca 125 farklı çeşitte β-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Bu peptidler arasından toplam 30 peptidin, DKIHPF, ELQDKIHPF, DELQDKIHPF, VLPVPQ, SLSQPKVLPVPQ, SLVYP, QSLTLTDVEK, FTGPIPN, MPFPKYPVEPF, HKEMPFPKYPVEPF, GPVRGPFP, GPVRGPFPI, LGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, VLGPVRGPFPI, VLGPVRGPFPIL, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPI, EPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFP, QEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPIL, YQEPVLGPVRGPFPILV, TQTPVVVPPF, TQTPVVVPPFLQP, TQTPVVVPPFLQPE, ILPLTQTPVVVPPF ve LHLPLPLVQSW,

180 günlük olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerin arasında kazesidin 15 ve 17 peptidlerinin de bulunduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde korunmuş peptidlerden bazılarının parçalanma ürünleri de belirlenmiştir ve bu korunmuş peptidlerin olgunlaşma süresince devamlı gözlemlenmesinin olgunlaşma süresinin başlarında çok yüksek miktarda meydana gelmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptid sayısı Karaman yöresine ait tulum peynirlerindekine yakın bulunurken, Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerindeki korunmuş peptid sayısına kıyasla daha fazla bulunmuştur. Bu durum, β-KN türevli peptid çeşidinin Ereğli ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde daha fazla olmasıyla ilişkilendirilebilir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptidlerden 9 tanesi (DKIHPF, ELQDKIHPF, DELQDKIHPF, SLSQPKVLPVPQ, QEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVRGPFPI, YQEPVLGPVRGPFPIL, TQTPVVVPPFLQPE) Anamur, Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde de tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Ancak, bu yörelerden farklı olarak yalnızca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli 10 peptidin (VLPVPQ, QSLTLTDVEK, FTGPIPN, HKEMPFPKYPVEPF, MPFPKYPVEPF, GPVRGPFP, GPVRGPFPI, LGPVRGPFPI, VLGPVRGPFP, TQTPVVVPPF) olgunlaşma süresi boyunca devamlı bulunduğu belirlenmiştir. Korunmuş peptidlerde yöresel olarak gözlemlenen bu değişimlerin peynir üretim metoduna ve peynirdeki mikrobiyotaya bağlı olarak tulum peynirlerinde bulunan proteolitik enzimlerin çeşitliliğindeki ve aktivitelerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in C terminal bölgesinden (21 adet) meydana geldiği, diğerlerinin ise β-KN'in N terminal (5 adet) ve orta (4 adet) bölgelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Gagnaire ve ark. (2011) da Ragusano peynirinin 7 ay olgunlaştırılması boyunca devamlı bulunan peptidlerin çoğunlukla C terminal bölgesinden meydana geldiğini ve β-KN'in N terminal ve orta bölgelerinden bazı peptidlerin de olgunlaşma süresi boyunca bulunduğunu tespit etmişlerdir. Sadat-Mekmene ve ark. (2013) Emmental peynirlerinin 40 gün olgunlaşma süresi boyunca β-KN türevli 32 peptidin devamlı bulunduğunu ve bu peptidlerin büyük bir çoğunluğunun β-KN'in N terminal bölgesinden geldiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Gómez-Ruiz ve ark. (2007) geleneksel olarak üretilen Manchego peynirlerinin 8 ay olgunlaşma süresi boyunca β-KN'in N terminal bölgesinden gelen 4 peptidinin devamlı bulunduğunu

belirlemişlerdir. Peynir çeşitlerine göre korunmuş peptidlerde gözlemlenen bu farklılıkların peynir üretim metoduna bağlı olarak proteolitik sistemin etkinliğinin farklı olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli korunmuş peptidlerin büyük bir çoğunluğunun (24 adet) hidrofobik ve nötral amino asitlerle bittiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu korunmuş peptidlerde β-KN (62-67) (DKIHPF), β-KN (93-102) (TQTPVVVPPF), β-KN (124-134) (MPFPKYPVEPF), β-KN (185-190) (VLPVPQ) ve β-KN (212-219) (GPVRGPFP) sekanslarını içeren korunmuş bölgelerin de bulunduğu fark edilmiştir. Taivosalo ve ark. (2018) Old Saare peynirinin 8 aylık olgunlaşma süresi boyunca genellikle β-KN türevli fosfopeptidlerin biriktiğini belirlemişlerdir. Protein kinaz enzimi vasıtasıyla serin (S), tirozin (Y) veya treonin (T) amino asitlerine fosfat grubunun eklenmesiyle proteinlerde fosforilizasyonun gerçekleştiği bildirilmiştir (Chalmers ve ark., 2004). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde fosforilize olmuş peptidler ayrıca belirlenmemiştir, ancak, olgunlaşma süresince korunmuş β-KN türevli peptidlerin bazılarında tirozin (Y), serin (S) veya treonin (T) amino asitleri görülmüştür. Dolayısıyla, bu peptidlerde de fosforilizasyon gerçeklemiş olabilir.

Biyoaktif peptidlerin yaklaşık 2-20 amino asit aralığında kısa zincirli peptidlerden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda (Hartmann ve Meisel, 2007), Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-KN türevli peptidlerin fonksiyonel özellik gösterme potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde meydana gelen β-KN türevli bazı peptidlerde ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, opioid, antienflamatuar, antikarsinojenik, beyin fonksiyonunu güçlendirici ve antiamnezik olmak üzere 12 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir. Biyolojik aktivite gösteren peptidler arasında en fazla ACE inhibitörü peptidlere rastlanmış olup bunu antioksidan ve antibakteriyal peptidler takip etmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde farklı biyolojik aktivite sayısı β- ve α_{s1}-KN türevli peptidlerde benzer bulunmuş olup, bu peptidlerin α_{s2}-KN türevli peptidlere kıyasla daha çeşitli biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, β- ve α_{s1}-KN türevli peptidler arasında farklı biyolojik özellikler gözlemlenmiştir. Obezite önleyici, cilt yenileyici, GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve antifungal peptidler yalnızca α_{s1}-KN türevli peptidlerde gözlemlenirken; opioid, kolesterol düzenleyici, katepsin B inhibitörü, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik peptidler yalnızca β-KN türevli peptidlerde belirlenmiştir. Ayrıca, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde fonksiyonel özellik

gösteren β-KN türevli peptid çeşitliliği Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinkinden daha yüksek bulunurken, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinden daha düşük bulunmuştur.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli 32 peptidin ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir ve β-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısı α_{s1}-KN türevli ACE inhibitörü peptid sayısından daha yüksek bulunmuştur. İlerleyen olgunlaşma sürelerinde farklı ACE inhibitörü peptidlerin meydana geldiği Çizelge 4.28.'den de görülmektedir. Ereğli yöresinde belirlenen β-KN türevli antihipertansif peptidler; DKIHP, DKIHPF, DELQDKIHPF, GVPKVKE, NVPGEIVE, LNVPGEIVE, GPVRGPF, GPVRGPFP, LGPVRGPFP, VLGPVRGPFP, EPVLGPVR, EPVLGPVRGPFP, EPVLGPVRGPFPIL, QEPVLGPVRGPFP, YQEPVLGPVR, YQEPVLGPVRGPF, YQEPVLGPVRGPFPILV, FTGPIPN, LPLPLL, HLPLP, LHLPLP, LHLPLPL, HLPLPLVQSW, VLPVP, SLVYP, LVYPFPGPIH, LVYPFPGPIHNSLPQ, LPQNILP, VPPFL, VVVPPF, TPVVVPPFLQP ve TQTPVVVPPFLQPEIM peptidlerinden oluşmaktadır. Antihipertansif bu peptidlerin çoğunluğu β-KN'in C terminal bölgesinden meydana gelmiştir ve bunu β-KN'in orta bölgesinden meydana gelen peptidler takip etmiştir.

DKIHP ve DKIHPF peptidlerinin ise sırasıyla 113.1 ve 2419.4 μM'lık IC_{50} değeri ile antihipertansif etki gösterdiği bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006). GPVRGPFP ve TPVVVPPFLQP peptidlerinin sırasıyla >1000 ve 749 μM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Hong ve ark., 2008). LGPVRGPFP ve QEPVLGPVRGPFP peptidlerinin %98.61 ACE inhibisyonu gösterdiği bildirilmiştir (Villegas ve ark., 2014). VLGPVRGPFP, VVVPPF, LHLPLP ve LHLPLPL peptidlerinin sırasıyla 137, >1500, 5.5 ve 425 μM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Quirós ve ark., 2007). SLVYP peptidinin ise 40 μM'lık IC_{50} değeri ile ACE inhibitörü özellik gösterdiği belirlenmiştir (Kohmura ve ark., 1990). VLPVP peptidinin yaklaşık %48.2 ACE inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2017). LVYPFPGPIH peptidinin 89 μM'lık IC_{50} değeri ile antihipertansif özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Pihlanto ve ark., 2010). Bounouala ve ark. (2017) *L. brevis* ve *Lc. lactis*'e ait hücre dışı proteinazların aktivitesiyle oluşan LHLPLPL, LHLPLP, VVVPPF, FTGPIPN, YQEPVLGPVRGPFPILV ve EPVLGPVR peptidlerinin yüksek düzeyde ACE inhibitörü potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

C terminal ucunda hidrofobik prolin amino asidi bulunan peptidlerin fenilalanin amino asidi bulunduranlara kıyasla daha yüksek ACE inhibitörü aktivitesi gösterdiği

bildirilmiştir (Gómez-Ruiz ve ark., 2006). Sonunda prolin ve fenilalanin amino asitlerini bulunduran β-KN türevli antihipertansif peptidler Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de belirlenmiştir. Hatta sonunda prolin amino asidi bulunduran ACE inhibitörü peptidlerin sonunda fenilalanin amino asidi bulunduranlardan daha yüksek sayıda olduğu görülmüştür. Genel olarak, ACE inhibitörü peptidler C terminal bölgesindeki son üç amino asidinde hidrofobik amino asit bulunmasıyla karakterize edilmektedir (Meisel, 1998). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli ACE inhibitörü peptidlerin 23 tanesinde fenilalanin (F), prolin (P), lösin (L), valin (V) ve metiyonin (M)'den oluşan hidrofobik amino asitlerin C terminal ucunda yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, HLPLPLVQSW peptidi haricinde diğer antihipertansif peptidlerin C terminal ucundaki son üç amino asitten birinin hidrofobik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, antihipertansif peptidlerin prolin, lizin ve aromatik amino asitleri (fenilalanin, triptofan ve tirozin) içerdiği bildirilmiştir (Suetsuna ve Nakano, 2000; Aslam ve ark., 2019). Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli antihipertansif peptidlerin de bu amino asitleri içerdiği gözlemlenmiştir.

Olgunlaşma süresinin 30. gününden olgunlaşma süresinin sonuna kadar gözlemlenen antihipertansif LPLPLL peptidinin insülin salımını artırarak tip II diyabeti üzerinde etkili olan DPP-4 inhibitörü özellik de gösterdiği bildirilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2016). Yani bu peptid, multifonksiyonel bir peptiddir. Diğer DPP-4 inhibitörü özellik gösteren peptidlerden LGPVRGPFPI peptidi tüm olgunlaşma süresi boyunca, HKEMPFPKYPVEP peptidi yalnızca olgunlaşma süresinin başında, TPVVVPP peptidi yalnızca olgunlaşma süresinin 90. gününde ve LPLPL peptidi yalnızca olgunlaşma süresinin 180. gününde belirlenmiştir. HKEMPFPKYPVEP peptidinin ayrıca kolon kanserini önlediği bildirilmiştir (Debruyne ve ark., 2006). Dolayısıyla, bu peptid de hem antikarsinojenik hem de DPP-4 inhibitörü olması nedeniyle multifonksiyonel bir peptiddir.

Hem ACE inhibitörü hem de antioksidan özelliklere sahip olduğu belirlenen (Rokka ve ark., 1997; Shanmugam ve ark., 2015) YQEPVLGPVR peptidi ise yalnızca olgunlaşma süresinin 7. gününde gözlemlenmiş olup, ilerleyen olgunlaşma günlerinde ileri derecede hidrolize olmuştur. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen diğer antioksidan peptidler ise TPVVVPPF, TPVVVPPFLQPE, TQTPVVVPPF, TQTPVVVPPFLQPE, LHLPLPLLQS ve YQEPVLGPVRGPFPIL peptidlerinden oluşmaktadır. Farvin ve ark. (2010) N terminal bölgesinde valin (V) ve lösin (L) gibi hidrofobik amino asitler bulunduran ve prolin (P), histidin (H), fenilalanin (F) ve tirozin

(Y) amino asitlerini içeren peptidlerin antioksidan özellik gösterdiğini bildirmiştir. Bu durum, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen β-KN türevli antioksidan peptidlerin fenilalanin, histidin, prolin, tirozin gibi hidrofobik amino asitleri içermesi ve bir antioksidan peptidin N terminal ucunda lösin amino asidinin bulunması ile tutarlılık göstermektedir. Antioksidan YQEPVLGPVRGPFPIL, TQTPVVVPPFLQPE ve TQTPVVVPPF peptidleri tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. YQEPVLGPVRGPFPIL peptidinin ayrıca kolesterol düşürücü özelliğe sahip bir peptid olduğu da bildirilmiştir (Mahdi ve ark., 2017). Antioksidan TPVVVPPF ve TPVVVPPFLQPE peptidlerinin ise olgunlaşma süresinin 30. gününde meydana geldiği ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde de bulunduğu belirlenmiştir. TPVVVPPFLQPE peptidinin ayrıca makrofaj hücrelerini uyararak antienflamatuar özellik gösterdiği bildirilmiştir (Bamdad ve ark., 2017). Antioksidan LHLPLPLLQS peptidi ise yalnızca olgunlaşma süresinin 60. gününde belirlenmiştir. Bu peptidin *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği de bildirilmiştir (Rana ve ark., 2018).

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan diğer antibakteriyal peptidlerden ELQDKIHPF, GPVRGPFPI ve YQEPVLGPVRGPFPI peptidleri tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenmiştir. Antibakteriyal PVVVPPFLQPE ve LPQNILPL peptidlerinin ise olgunlaşma süresinin 60. gününde meydana geldiği ve olgunlaşma süresinin sonuna kadar bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, olgunlaşma süresinin son gününde antibakteriyal NILPL peptidinin meydana geldiği belirlenmiştir. NILPL, LPQNILPL, GPVRGPFPI ve ELQDKIHPF peptidlerinin *Lactobacillus sakei* A15 suşuna karşı antibakteriyal özellik gösterdiği bildirilmiştir (Losito ve ark., 2006). PVVVPPFLQPE peptidinin *E. coli* K12, *B. cereus* RT INF01 ve *L. monocytogenes* suşlarının gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Almaas ve ark., 2011). Kazesidin 15 peptidi olan YQEPVLGPVRGPFPI peptidinin ise *E. coli* DH5α, *E. coli* DPC6053 ve *Enterobacter sakazakii* DPC5120 suşlarına karşı sırasıyla 0.5, 0.4 ve >1.0 mg/mL'lik MIC değeri ile antibakteriyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Birkemo ve ark., 2009).

Sakinleştirici veya uyuşturucu özellik gösteren YPFPGPIHNSLPQ (β-kazomorfin 13) peptidinin olgunlaşma süresinin 30. gününde meydana geldiği ve olgunlaşma süresinin sonuna kadar bulunduğu tespit edilmiştir. Bir diğer opioid peptid olan YPFPGPIH (β-kazomorfin 8) peptidine ise yalnızca olgunlaşma süresinin 60. gününde rastlanmıştır ve bu peptid ilerleyen olgunlaşma günlerinde ileri derecede hidroliz olmuştur. İmmünomodülatör özellik gösteren EPVLGPVRGPFPI peptidi tüm olgunlaşma süresi boyunca gözlemlenirken, diğer bir immünomodülatör peptid olan

QEPVLGPVRGPF peptidi ise olgunlaşma süresinin 30., 60. ve 90. günlerinde belirlenmiştir. Kruzel (2011) EPVLGPVRGPFPI peptidinin immünolojik hastalıkların, özellikle astımın önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, katepsin B inhibitörü olan GPFPI peptidinin olgunlaşma süresinin 30. gününde meydana geldiği ve olgunlaşma süresinin sonuna kadar bulunduğu tespit edilmiştir. Lee ve Lee (2000) katepsin B'nin protein düzensizliğine neden olarak kemik erimesi, yetersiz kas gelişimi ve tümör metastazı (yayılması) gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol alan lizozomal sistein proteazlardan biri olduğunu bildirmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde beyin fonksiyonlarını artıran ve unutkanlığı önleyen NIPPLTQTPVVVPPFLQP ve NIPPLTQTPVVVPPFLQPE peptidlerinin de bulunduğu belirlenmiştir. Bu peptidlerin olgunlaşma süresinin sonunda oluştuğu gözlemlenmiştir.

4.3.5. Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde peptid dinamiğinin ve biyoaktif özelliklerin genel olarak karşılaştırılması

Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca α_{s1}- ve β-KN türevli peptidlerin oranı zıt bir seyir izlemiştir. Bu süreçte tulum peynirlerinde belirlenen peptid modellerinde genel olarak β-KN türevli peptidlerin oranı artarken, α_{s1}-KN türevli peptidlerin oranının ise azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durumun olgunlaşma süresince α_{s1}-KN türevli peptidlere kıyasla daha fazla miktarda β-KN türevli peptidlerin meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunlarla birlikte, α_{s2}-KN türevli peptidlerin çok az sayıda meydana geldiği ve bu peptidlerin oranının ise neredeyse aynı kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar gözlemlenen κ-KN türevli peptid oranının da sabit kaldığı söylenebilir. α_{s1}-KN'in kimozine karşı oldukça hassas olduğu, sütün endojen enzimlerinin aktivitesi ile sınırlı hidrolize olduğu ve mikrobiyal proteolitik enzimlerle de hidrolize olduğu bildirilmiştir (Ardö ve ark., 2017). α_{s2}- ve β-KN'lerin kimozin ile hidrolizinin sınırlı olduğu, genellikle sütün endojen enzimleri ve mikrobiyal enzimler tarafından parçalandığı bildirilmiştir (McSweeney ve ark., 1994; Fox ve McSweeney, 1996; Ardö ve ark., 2017; Taivosalo ve ark., 2018). κ-KN'in koagülant ile parçalanması sonucu peynirde kalan *para*-κ-KN'in ise hidrolize karşı oldukça dirençli olduğu ve sütteki endojen enzimler veya mikrobiyal proteolitik enzimler tarafından sınırlı düzeyde parçalanabildiği belirlenmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1993; Larsen ve ark., 1996; Law

ve Haandrikman, 1997; Manguy ve Shields, 2019). Daha yüksek oranda β-KN türevli peptidlerin meydana gelmesinin peynirde bulunan mikrobiyotaya ait proteolitik enzimlerden kaynaklandığı öngörülmektedir. Mikrobiyal proteolitik enzimlerin α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-KN'lere kıyasla daha çok β-KN üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Requena ve ark., 1993; Igoumenidou ve ark., 2005; Veljovic ve ark., 2009; Miclo ve ark., 2012; Solieri ve ark., 2018; Fan ve ark., 2019). Bu çalışmanın bulguları ile benzer şekilde, Sadat-Mekmene ve ark. (2013) sıvı buzağı renneti ve *L. helveticus*, *S. thermophilus* ve propiyonik starter bakteriler kullanılarak pastörize inek sütünden üretilen Emmental peynirlerinde diğer peptidlere kıyasla β-KN türevli peptidlerin daha yüksek oranda bulunduğunu belirlemişlerdir.

Anamur ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresi boyunca devamlı azalmıştır. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresinin başında %47 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda %39 olarak belirlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranı ise olgunlaşma süresinin başında %40 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda %27 olarak tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranının olgunlaşma süresinin 7. ve 60. günlerinden sonra azaldığı gözlemlenmiştir. Bu yöreye ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresinin başında %41, olgunlaşma süresinin 30. ve 60. günlerinde %40 ve olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde %39 olarak belirlenmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresi boyunca dalgalı bir seyir göstermiştir ve olgunlaşma süresinin sonunda %42 olarak belirlenmiştir.

Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid oranı dalgalı bir seyir göstermekle birlikte olgunlaşma süresinin başında ve sonunda aynı bulunmuştur. Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda α_{s2}-KN türevli peptid oranı sırasıyla %2, 2, 4 ve 2 olarak tespit edilmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde κ-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresinin başında %2 olarak tespit edilirken olgunlaşma süresinin sonunda κ-KN türevli peptidlerin bulunmadığı belirlenmiştir. Bu durumun, olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar belirlenen κ-KN türevli peptidlerin ilerleyen olgunlaşma günlerinde ileri derecede hidroliz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anamur ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresi boyunca devamlı artış göstermiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresinin başında %51 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda %59 olarak belirlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid oranı ise olgunlaşma süresinin başında %54 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda %69 olarak tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin başında %57 olarak belirlenen β-KN türevli peptid oranı olgunlaşma süresinin 30. gününde %59'a çıkmış olup, ilerleyen olgunlaşma günlerinde aynı kalmıştır. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid oranı α_{s1}-KN türevli peptid oranında olduğu gibi olgunlaşma süresi boyunca dalgalı bir seyir göstermiştir ve olgunlaşma süresinin sonunda %56 olarak belirlenmiştir.

Yöreler arasında peptid dinamiğinde gözlemlenen bu farklılıkların; peynir üretiminde kullanılan süt çeşidi ve kompozisyonu, koagülant çeşidi ve miktarı, üretim tekniği ve olgunlaşma süresince peynirde bulunan mikrobiyota ile ilgili farklılıklara bağlı olarak proteolitik sistemdeki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tulum peyniri örneklerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca farklı yörelere göre gözlemlenen peptid dinamiği Çizelge 4.29.'da ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Bu çizelgeden tüm yörelere ait tulum peynirlerinde belirlenen toplam peptid sayısının olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile arttığı görülmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca toplam peptid sayısındaki artış proteolizin göstergesi olan suda çözünebilir azot içeriklerinin artmasıyla paralellik göstermektedir. Ayrıca, SDS-PAGE analizinde olgunlaşma süresince α_s- ve β-KN'lerin miktarlarında gözlemlenen azalma olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile bu kazeinlerinden peptidlerin meydana geldiğini desteklemektedir. Anamur ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde toplam peptid sayısında en çok artışın olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra meydana geldiği gözlemlenmiştir. Mut ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde ise toplam peptid sayısında en fazla artış sırasıyla olgunlaşma süresinin 7. ve 90. günlerinden sonra tespit edilmiştir. Peptid sayısında en fazla artışın görüldüğü olgunlaşma süresinde proteolitik sistemin daha aktif olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.29. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinde 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen peptid dinamiği

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)	KN kaynakları [a]				Toplam [b]
		α_{s1}-KN	α_{s2}-KN	β-KN	κ-KN	
Anamur yöresi	**7**	22	1	24	0	47
	30	27	1	32	0	60
	60	33	1	42	0	76
	90	35	2	51	0	88
	180	37	2	57	0	96
	Toplam [c]	45	2	73	0	
Mut yöresi	**7**	23	1	32	0	56
	30	29	1	43	0	73
	60	35	1	52	0	88
	90	43	2	64	0	109
	180	57	6	97	0	160
	Toplam [c]	65	7	107	0	
Karaman yöresi	**7**	37	4	51	2	94
	30	45	5	66	3	119
	60	44	3	83	2	132
	90	42	3	88	0	133
	180	39	5	99	0	143
	Toplam [c]	59	11	129	4	
Ereğli yöresi	**7**	37	2	50	0	89
	30	49	3	57	0	109
	60	60	3	74	0	137
	90	69	5	78	0	152
	180	66	3	89	0	158
	Toplam [c]	88	9	125	0	

[a] KN: kazein.
[b] Aynı olgunlaşma süresinde toplam α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-KN türevli peptidlerin sayısını ifade etmektedir.
[c] α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-KN türevli peptidlerin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca ayrı ayrı çeşitliliğini ifade etmektedir.

En fazla α_{s1}-KN türevli peptid çeşitliliği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup, bunu sırasıyla Mut, Karaman ve Anamur yörelerine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak α_{s1}-KN türevli peptid sayısının da arttığı belirlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ise α_{s1}-KN türevli peptid sayısının olgunlaşma süresinin 30. gününde arttıktan sonra ilerleyen olgunlaşma günlerinde az miktarda azaldığı, ancak, olgunlaşma süresinin başına kıyasla olgunlaşma süresinin sonunda daha fazla miktarda α_{s1}-KN türevli peptid bulunduğu tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 22 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda 45 olarak tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra gözlemlenmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 23 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda 57

olarak tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 37 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda 39 olarak bulunmuştur. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısı yalnızca olgunlaşma süresinin 7. gününden sonra artış göstermiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ise α_{s1}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 37 olarak tespit edilirken, olgunlaşma süresinin sonunda 45 olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s1}-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 7. gününden sonra gözlemlenmiştir.

En fazla α_{s2}-KN türevli peptid çeşitliliği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiş olup, bunu sırasıyla Ereğli, Mut ve Anamur yörelerine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Çizelge 4.29.'dan da görüldüğü gibi, α_{s2}-KN türevli peptid sayısı α_{s1}- ve β-KN türevli peptid sayısına kıyasla oldukça az bulunmuştur. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde 2 adet α_{s2}-KN türevli peptid belirlenmiş olup, bu peptidlerden biri tüm olgunlaşma süresince gözlemlenmiş olup diğeri olgunlaşma süresinin 90. ve 180. günlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin başında Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı 1 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda ise 6 olarak tespit edilmiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinden sonra artış göstermiş olup, en fazla artış olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra gözlemlenmiştir. Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresi boyunca dalgalı bir seyir izlemiş olup, bu yörelere ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin sonunda olgunlaşma süresinin başına kıyasla 1 fazla α_{s2}-KN türevli peptid bulunduğu belirlenmiştir.

En fazla β-KN türevli peptid çeşitliliği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup, bunu sırasıyla Ereğli, Mut ve Anamur yörelerine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Tüm yörelere ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak artmıştır. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 24 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda 57 olarak tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra gözlemlenmiştir. Mut yöresine ait tulum

peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 32 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda 97 olarak tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Mut yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 90. gününden sonra gözlemlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 51 olarak bulunurken, olgunlaşma süresinin sonunda 99 olarak tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde β-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra gözlemlenmiştir. Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ise β-KN türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin başında 50 olarak tespit edilirken, olgunlaşma süresinin sonunda 89 olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde de β-KN türevli peptid sayısında en fazla artış olgunlaşma süresinin 30. gününden sonra gözlemlenmiştir.

Yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 60. gününe kadar 4 farklı çeşitte κ-KN türevli peptid tanımlanmıştır. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenen α_{s1}-, α_{s2}- ve β-KN türevli peptidlere kıyasla çok az κ-KN türevli peptid türevli peptid tespit edilmiştir. Bu durum, κ-KN'in peynirdeki proteolize olan direncini göstermektedir. Olgunlaşma süresinin 7., 30. ve 60. günlerinde belirlenen κ-KN türevli peptid sayısı birbirine yakın bulunmuştur. İlerleyen olgunlaşma günlerinde ise belirlenen bu κ-KN türevli peptidlerin ileri derecede hidrolize olduğu ve proteolize oldukça dirençli olan κ-KN'den yeni peptidlerin meydana gelmediği belirlenmiştir.

Tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-KN türevli peptidlerin fonksiyonel özellikleri de araştırılmıştır. Bu peptidler kısa zincirli amino asit R gruplarından meydana gelmiştir. Hartmann ve Meisel (2007) 2-20 amino asit R gruplarını içeren peptidlerin fonksiyonel özellik gösterdiğini bildirmiştir. Nitekim, Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 2-20 amino asit R gruplarına sahip bazı α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-KN türevli peptidlerin biyoaktif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Tulum peyniri örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidlerin yörelere ve 180 günlük olgunlaşma süresine göre değişimi Çizelge 4.30.'da sunulmaktadır. Tulum peyniri örneklerinde gözlemlenen biyoaktif peptid sayısının genellikle olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile arttığı tespit edilmiştir. Yani ilerleyen olgunlaşma günlerinde biyoaktif özelliklere sahip yeni peptidler meydana gelmiştir.

Çizelge 4.30. Farklı yörelere ait tulum peyniri örneklerinde 180 günlük olgunlaşma süresince belirlenen biyoaktif peptidlerin değişimi

Fonksiyonel özellikler	Anamur yöresi					Mut Yöresi					Karaman yöresi					Ereğli yöresi				
	Olgunlaşma süresi (gün)																			
	7	**30**	**60**	**90**	**180**	**7**	**30**	**60**	**90**	**180**	**7**	**30**	**60**	**90**	**180**	**7**	**30**	**60**	**90**	**180**
ACE inhibitörü [a]	16	23	25	26	24	21	25	26	34	45	34	37	39	42	42	28	35	41	46	47
Antibakteriyal	7	6	6	7	7	4	4	6	5	6	5	8	7	9	8	7	7	12	11	10
Antioksidan	3	4	5	5	4	4	4	5	6	6	6	7	9	9	8	6	8	10	10	10
Antikarsinojenik	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1
GLP-1 artırıcı [b]	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3
DPP-4 inhibitörü [c]	0	1	1	1	2	0	1	3	5	5	3	5	5	6	6	4	7	7	8	8
İmmünomodülatör	1	0	1	0	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3	1
Beyin fonksiyonu artırıcı	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	2	2	3	0	0	0	0	2
Kolestrol düzenleyici	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Antifungal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Antidiyabetik (tip II)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Obezite önleyici	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Antienflamatuar [d]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	2
Cilt yenileyici	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Opioid [e]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	1	1
Katepsin B inhibitörü [f]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Metal şelatlama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Antiamnezik [g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	0	0	0	0	1
PEP inhibitörü [h]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Toplam	**30**	**37**	**41**	**43**	**41**	**33**	**37**	**43**	**55**	**70**	**55**	**68**	**74**	**79**	**79**	**53**	**70**	**84**	**91**	**92**

[a] Tansiyon düşürücü; [b] Glukagon benzeri peptid-1 sekresyonunu artırarak insülin salımını artırır ve iştahı azaltır; [c] Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü, tip II diyabeti tedavisinde kullanılmaktadır, [d] İltihap oluşumunu önleyici; [e] Uyuşturucu, sakinleştirici; [f] Katepsin B, patolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır; [g] Antiamnezik, unutkanlık önleyici; [h] Prolil endopeptidaz (PEP) inhibitörü, beyin fonksiyonlarını güçlendirici.

Çizelge 4.30.'dan da görüldüğü gibi olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile toplam biyoaktif peptid sayısında da artış belirlenmiştir. Bazı biyoaktif peptidlerin olgunlaşma süresinin ilerleyen günlerinde meydana geldiği görülmüştür. Tulum peyniri örneklerin çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip peptidler tespit edilmiştir. Bu peptidler arasından antihipertansif peptidlerin büyük bir payı aldığı dikkat çekmektedir. Bunu antioksidan ve antibakteriyal peptidler takip etmiştir. DPP-4 inhibitörü peptidler de tip II diyabetini önlemektedir, ancak, farklı mekanizma ile tip II diyabetini önleyen peptidler ayrı verilmiştir. Ayrıca, PEP inhibitöründen farklı bir mekanizma ile beyin fonksiyonunu geliştirici peptidler de ayrı olarak sunulmuştur. En fazla fonksiyonel peptid çeşitliliği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup, bunu sırasıyla Karaman, Mut ve Anamur yörelerine ait tulum peynirleri izlemiştir. Tüm tulum peyniri örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidler arasında β-KN türevli peptidler daha yüksek oranda bulunmuştur.

Obezite önleyici, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, metal şelatlayıcı, cilt yenileyici ve antifungal peptidler α_{s1}-KN türevli peptidlerden belirlenirken; beyin fonksiyonunu artırıcı, antiamnezik, opioid ve katepsin B inhibitörü peptidler β-KN türevli peptidlerden

tespit edilmiştir. Ayrıca, kolesterol düzenleyici etki α_{s2}- ve β-KN türevli peptidlerden belirlenmiştir. Diğer biyoaktif peptidler hem α_{s1}-KN hem de β-KN türevli peptidlerde görülmüştür. α_{s2}-KN türevli peptidlerde yalnızca antihipertansif, antioksidan, antibakteriyal ve kolesterol düzenleyici peptidler gözlemlenirken, κ-KN türevli peptidlerde ise yalnızca antihipertansif, antioksidan ve DPP-4 inhibitörü peptidler gözlemlenmiştir.

En fazla sayıda antihipertansif, antioksidan, antibakteriyal, antikarsinojenik, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, antienflamatuar ve opioid peptidler Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. GLP-1 sekresyonunu ve beyin fonksiyonunu artırıcı peptidlerin sayısı Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde daha yüksek bulunmuştur. Kolesterol düzenleyici peptidler Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde daha yüksek sayıda tespit edilmiştir. Antifungal ve obezite önleyici peptidlere yalnızca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır. Cilt yenileyici ve antiamnezik peptidler ise yalnızca Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, PEP inhibitörü 1 peptid yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilirken, katepsin B inhibitörü 1 peptid ise Anamur yöresine ait tulum peynirleri dışındaki tüm peynirlerde belirlenmiştir.

Çizelge 4.31. Toplam biyoaktif peptid değişimi

Tulum peynirleri	Olgunlaşma süresi (gün)					Derece	%
	7	30	60	90	180		
Anamur yöresi	30	37	41	43	41	**	37
Mut yöresi	33	37	43	55	70	***	112
Karaman yöresi	55	68	74	79	79	****	44
Ereğli yöresi	53	70	84	91	92	*****	74

Çizelge 4.31.'de toplam biyoaktif peptid sayısının 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca değişimi sunulmaktadır. Olgunlaşma süresinin sonunda en yüksek biyoaktif peptid sayısı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük biyoaktif peptid sayısı ise Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Bu bulgular meydana gelen toplam peptid sayısı ile paralellik göstermiştir. En fazla peptid sayısının gözlemlendiği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde diğer yörelere ait tulum peynirlerinden farklı olarak meydana peptidlerin de biyoaktif özelliğe sahip olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, olgunlaşma süresi boyunca biyoaktif peptid sayısındaki en fazla artış (%112) Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup, bunu sırasıyla

Ereğli, Karaman ve Anamur yörelerine ait tulum peynirleri takip etmiştir. Dolayısıyla en fazla biyoaktif peptid sayısı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, biyoaktif peptid oluşumu açısından en yüksek performans ise Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Bu durum 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca en yüksek olgunlaşma derecesinin Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmesi ile uyumlu bulunmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, Orta Toroslar bölgesinde bulunan Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerinden geleneksel yöntemler kullanılarak çiğ sütten (starter kültür kullanılmadan) üretilen deri tulum peynirleri üretimi takiben yöresel üreticilerden temin edilmiştir. Bu kapsamda, 4 lokasyon, 3 biyolojik tekerrür ve 5 farklı olgunlaştırma süresi (7., 30., 60., 90. ve 180. günler) hesaplanarak çalışmada kullanılan toplam 60 adet yaklaşık 3-3.5 kg'lık deri tulum peynirleri her yörede farklı üreticilerle üretilmiştir. 4-6 °C ve %85 nispi nem koşulları altında 180 gün boyunca kontrollü şartlarda olgunlaştırmaya bırakılan tulum peynirlerinde olgunlaşma süresinin 7., 30., 60., 90. ve 180. günlerinde fizikokimyasal analizler, SDS-PAGE analizi ile proteoliz takibi ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) analizi ile bu tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında bulunan peptidlerin tanımlanması ve peptid dinamiğinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, elde edilen peptid sekansları BIOPEP, EROP-Moscow, PepBank, PeptideDB, Milk Bioactive Peptide Database ve Google Scholar veri tabanlarında taranarak tanımlan peptidlerin fonksiyonel özellikleri de tespit edilmiştir.

Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde kuru madde ortalamaları sırasıyla %53.78, 52.85, 58.09 ve 56.99 olarak belirlenmiştir ve olgunlaşma süresince gerçekleşen nem kaybına bağlı olarak tulum peynirlerinin kuru madde içeriklerinin arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). En yüksek yağ içeriği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde ortalama %26.64 olarak belirlenirken, en düşük yağ içeriği ise ortalama %23.49 olarak Anamur ve Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. Kül içerikleri %3.79-5.56 arasında değişmiştir ve en yüksek kül içeriği ortalama %4.93 ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenirken, en düşük kül içeriği ise ortalama %4.39 ile Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca tuz içerikleri %2.09-2.64 arasında tespit edilmiş olup, en yüksek ortalama tuz içeriği %2.42 ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. Tulum peynirlerinin titrasyon asitliği değerlerinde olgunlaşma süresi sonunda önemli düzeyde artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresi boyunca gelişen titrasyon asitliğine rağmen, artan kuru madde içeriği ve azalan su aktivitesi değerlerine bağlı olarak buffer kapasitesinin artmasından dolayı pH değerlerinde önemli düzeyde bir azalış

gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Tulum peynirlerinde en yüksek ortalama pH değeri 5.01 ile Anamur ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirinde belirlenirken, en düşük ortalama pH değeri ise 4.87 ile Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Su aktivitesi değerlerinin olgunlaşma süresince önemli düzeyde azaldığı belirlenmiş olup ($p<0.05$), bu süre boyunca tulum peynirlerinin su aktivitesi değerlerinin 0.885-0.950 arasında bulunduğu tespit edilmiştir.

Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde ortalama protein içerikleri sırasıyla %24.76, 24.59, 25.77 ve 26.26 olarak tespit edilmiştir. Suda çözünen azot içerikleri %0.27-0.61 arasında değişmiştir ve olgunlaşma süresince gerçekleşen proteolize bağlı olarak tulum peynirlerinin suda çözünen azot içeriklerinde önemli düzeyde artış belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, olgunlaştırma süresinin 90. gününe kadar suda çözünen azot içeriklerinde yöreler arasında farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Kazein azotu içerikleri ise %85.83-92.61 arasında değişiklik göstermiş olup, olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirlerinin kazein azotu içeriklerinin önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile olgunlaşma derecesinin de önemli düzeyde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$) ve olgunlaşma süresinin sonunda en yüksek olgunlaşma derecesi %14.17 değeri ile Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiş olup bunu sırasıyla Karaman, Anamur ve Ereğli yöresine ait tulum peynirleri takip etmiştir.

SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre α_s- ve β-kazeinlerin olgunlaşma süresinin ilerlemesine paralel olarak önemli ölçüde hidrolize olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma süresince κ-kazein hidrolizine ise yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde rastlanmıştır. Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresinin sonunda α_s-kazein oranları sırasıyla %55.41, 48.04, 35.49 ve 25.80 olarak bulunmuş olup, en fazla α_s-kazein hidrolizi Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda β-kazein oranları %37.90-48.25 arasında gözlemlenmiş olup, en fazla β-kazein hidrolizi Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tespit edilmiştir. κ-kazeinin ise Anamur, Mut ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca neredeyse değişmeden kaldığı belirlenmiş olup, Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ise olgunlaşma süresinin sonunda %55.56 oranında κ-kazeinin bulunduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde α_s-kazein miktarları sırasıyla 14.26-28.13, 12.51-28.78, 4.40-14.03 ve 2.74-13.41 mg/g arasında

tespit edilmiştir. En yüksek α_s-kazein miktarı Mut yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca β-kazein miktarı sırasıyla 55.56-118.73, 51.44-132.03, 31.52-100.68 ve 44.67-100.10 mg/g arasında belirlenmiştir. En yüksek β-kazein miktarı yine Mut yöresine ait tulum peynirlerinde gözlemlenmiştir. κ-kazein miktarı ise olgunlaşma süresince 0.27-1.52 mg/g arasında tespit edilmiş olup, en yüksek κ-kazein miktarı Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir.

Olgunlaşma süresince gerçekleştirilen kromatografik analizler sonucunda tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarındaki peptid profilinin yöresel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, olgunlaşma süresince peptid dinamiğinin değişimi tüm tulum peynirlerinde benzer bulunmuştur. Tüm tulum peynirlerinde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca β-kazein türevli peptid oranı artarken, α_{s1}-kazein türevli peptid oranı azalmıştır. Yani, bu peptidlerin toplam peptid modelindeki oranları zıt bir seyir izlemiştir. Bununla birlikte, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptid oranlarının ise olgunlaşma süresince neredeyse sabit kaldığı tespit edilmiştir. α_{s1}- ve β-kazeinlere kıyasla α_{s2}- ve κ-kazeinlerin peynirde gerçekleşen proteolize karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde β-kazein türevli peptid oranları sırasıyla %59, 59, 69 ve 56 olarak belirlenirken, α_{s1}-kazein türevli peptid oranları sırasıyla %39, 39, 27 ve 42 olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptid oranları ise sırasıyla %1-4 ve 2-3 arasında tespit edilmiştir. Tulum peynirlerinde en fazla β-kazein türevli peptidler tanımlanmış olup, bunu sırasıyla α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptidler takip etmiştir.

Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile sırasıyla 45, 65, 59 ve 88 çeşit α_{s1}-kazein türevli peptid tanımlanmıştır ve en fazla α_{s1}-kazein türevli peptid çeşitliliği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Bu peptidlerin, genellikle α_{s1}-kazeinin N terminal bölgesinden meydana geldiği gözlemlenmiştir. Anamur ve Karaman yörelerine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidlerin 5-14 amino asit uzunluğuna sahip olduğu belirlenirken, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidlerin 5-21 ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidlerin 5-23 amino asit uzunluğundan oluştuğu tespit edilmiştir. Bu α_{s1}-kazein türevli peptidler arasından Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde

hekzapeptidlerin, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde penta-, hekza- ve heptapeptidlerin, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde penta- ve hekzapeptidlerin ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde hekzapeptidlerin baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile yeni peptidlerin meydana gelmesine bağlı olarak α_{s1}-kazein türevli peptid sayısının da arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bu olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde sırasıyla 20, 21, 26 ve 27 çeşit α_{s1}-kazein türevli peptidin devamlı bulunduğu belirlenmiştir.

180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile sırasıyla 2, 7, 11 ve 9 çeşit α_{s2}-kazein türevli peptid tanımlanmıştır ve en fazla α_{s2}-kazein türevli peptid çeşitliliği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Bu peptidlerin, genellikle α_{s2}-kazeinin orta ve C terminal bölgelerinden meydana geldiği tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde 6 ve 8 amino asit uzunluğuna sahip iki peptid tespit edilmiştir. Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde ise sırasıyla 5-10, 6-15 ve 5-15 amino asit uzunluğuna sahip α_{s2}-kazein türevli peptidlerin bulunduğu belirlenmiştir. Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerine kıyasla Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde daha uzun zincirli α_{s2}-kazein türevli peptidler tanımlanmıştır. Bu α_{s2}-kazein türevli peptidlerden Mut yöresine ait tulum peynirlerinde heptapeptidlerin, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde penta- ve heptapeptidlerin ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde hekza-, hepta- ve pentadekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde 1 peptidin olgunlaşma süresi boyunca korunduğu ve olgunlaşma süresinin 60. gününden sonra α_{s2}-kazein türevli 1 peptidin daha meydana geldiği tespit edilmiştir. Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde olgunlaşma süresi boyunca korunmuş α_{s2}-kazein türevli peptid belirlenmemiştir. Mut yöresine ait tulum peynirlerinde α_{s2}-kazein türevli peptid sayısı olgunlaşma süresinin 60. ve 90. günlerinden sonra artış göstermiştir. Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde ise α_{s2}-kazein türevli peptid sayısı olgunlaşma süresi boyunca dalgalı bir seyir göstermiştir.

Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile sırasıyla 73, 107, 129 ve 125 çeşit β-kazein türevli peptid tanımlanmıştır ve en fazla β-kazein türevli peptid çeşitliliği Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. β-kazein türevli bu peptidlerin, genellikle β-kazeinin C terminal bölgesinden meydana geldiği gözlemlenmiştir. Anamur ve Ereğli

yörelerine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-kazein türevli peptidlerin 5-24 amino asit uzunluğuna sahip olduğu belirlenirken, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-kazein türevli peptidlerin 5-22 ve Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-kazein türevli peptidlerin 5-23 amino asit uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu β-kazein türevli peptidlerden Anamur ve Mut yörelerine ait tulum peynirlerinde pentapeptidlerin, Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde penta- ve undekapeptidlerin ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde undekapeptidlerin baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir. α_{s1}- ve α_{s2}-kazein türevli peptidlere kıyasla daha çok sayıda uzun β-kazein türevli peptidlerin bulunduğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile gerçekleşen proteolize bağlı olarak β-kazein türevli peptid sayısının da arttığı tespit edilmiştir. 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerine ait tulum peynirlerinde sırasıyla 14, 26, 32 ve 30 çeşit β-kazein türevli peptidin devamlı bulunduğu belirlenmiştir.

Olgunlaşma süresi boyunca yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinin suda çözünebilir ekstraktlarında LC-MS/MS ile 4 çeşit κ-kazein türevli peptid tanımlanmıştır. κ-kazein türevli bu peptidlerin 5-7 amino asit uzunluğuna sahip olduğu ve pentapeptidlerin baskın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Bu peptidlerden 1 tanesinin hidrofilik glikomakropeptid bölgesinden ve 3 tanesinin hidrofobik *para*-κ-kazein bölgesinden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu peptidler olgunlaşma süresinin yalnızca 60. gününe kadar gözlemlenmiştir ve ilerleyen olgunlaşma günlerinde ileri derecede hidrolize oldukları belirlenmiştir.

Olgunlaşma süresince tulum peynirlerinde tanımlanan peptidlerin fonksiyonel özellikleri BIOPEP, EROP-Moscow, PepBank, PeptideDB, Milk Bioactive Peptide Database ve Google Scholar gibi online veri tabanları kullanılarak incelenmiştir. Tulum peynirlerinde meydana gelen α_{s1}-, α_{s2}-, β-ve κ-kazein türevli peptidlerin çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. En fazla biyoaktif peptid sayısı ve çeşitliliği β-kazein türevli peptidlerde belirlenmiş olup, bunu sırasıyla α_{s1}-, α_{s2}- ve κ-kazein türevli peptidler izlemiştir.

Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidlerin diğer yörelere ait tulum peynirlerinde tanımlanan α_{s1}-kazein türevli peptidlere kıyasla daha çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 40 adet α_{s1}-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antifungal, antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuar,

antikarsinojenik, immünomodülatör, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü, cilt yenileyici ve obezite önleyici özelliklerden oluşmak üzere 12 farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 21 adet α_{s1}-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü ve antikarsinojenik özelliklerden oluşmak üzere 6 farklı biyolojik aktivite, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 22 adet α_{s1}-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı ve DPP-4 inhibitörü özelliklerden oluşmak üzere 5 farklı biyolojik aktivite ve Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 27 adet α_{s1}-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, GLP-1 sekresyonunu artırıcı, DPP-4 inhibitörü, cilt yenileyici ve metal şelatlayıcı özelliklerden oluşmak üzere 7 farklı biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm tulum peynirlerinde bu biyoaktif peptidler arasından antihipertansif peptidlerin en yüksek payı aldığı gözlemlenmiştir.

α_{s2}-kazein türevli peptidler açısından en çeşitli biyoaktivite Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde belirlenmiştir. Olgunlaşma süresince Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 3 α_{s2}-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal ve antioksidan özelliklerden oluşmak üzere 3 farklı fonksiyonel özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde antibakteriyal α_{s2}-kazein türevli 1 peptid, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde hem ACE inhibitörü hem de kolesterol düzenleyici α_{s2}-kazein türevli 1 peptid ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde ACE inhibitörü ve antibakteriyal özellik gösteren α_{s2}-kazein türevli iki peptid tanımlanmıştır. Yalnızca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan κ-kazein türevli peptidlerde ise ACE inhibitörü, DPP-4 inhibitörü ve antioksidan özelliklerden oluşmak üzere 3 farklı biyolojik aktivite tespit edilmiştir.

En çeşitli fonksiyonel özellikler β-kazein türevli peptidlerde belirlenmiştir. Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-kazein türevli peptidlerin diğer yörelere ait tulum peynirlerinde tanımlanan β-kazein türevli peptidlere kıyasla daha çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca Karaman yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 60 adet β-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, antienflamatuar, antikarsinojenik, immünomodülatör, opioid, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, prolil endopeptidaz (PEP) inhibitörü, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik özelliklerden oluşmak üzere 13 farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Anamur yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 27 adet β-kazein türevli peptidin

ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik özelliklerden oluşmak üzere 8 farklı biyolojik aktivite, Mut yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 45 adet β-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, immünomodülatör, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik özelliklerden oluşmak üzere 9 farklı biyolojik aktivite ve Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinde tanımlanan 55 adet β-kazein türevli peptidin ACE inhibitörü, antibakteriyal, antioksidan, antienflamatuar, antikarsinojenik, immünomodülatör, opioid, DPP-4 inhibitörü, katepsin B inhibitörü, kolesterol düzenleyici, beyin fonksiyonunu artırıcı ve antiamnezik özelliklerden oluşmak üzere 12 farklı biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. α_{s1}-kazein türevli biyoaktif peptidlerde olduğu gibi tüm tulum peynirlerinde β-kazein türevli biyoaktif peptidlerde de antihipertansif peptidler daha yüksek sayıda belirlenmiştir. Ayrıca, β-kazein türevli antihipertansif peptid sayısının α_{s1}-kazein türevli antihipertansif peptid sayısından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

5.2. Öneriler

Peptidomik verilere dayanarak 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca geleneksel deri tulum peynirlerinde gerçekleşen proteolizin kapsamlı bir verisi elde edilmiştir. Bu sonuçlar geleneksel deri tulum peynirlerinin özgünlüğünü belirlemek için bir belirteç olarak kullanılabilir. Peptid profilinin karakterizasyonu Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerinde üretilen geleneksel deri tulum peynirleri için orijinin korunmuş adı (PDO-Protected Designation of Origin), korunmuş coğrafi işaret (PGI-Protected Geographical Indication) ve garanti altına alınmış geleneksel özellikler (TSG-Traditional Speciality Guaranteed) gibi AB düzenlemelerine yönelik yapılacak çalışmalara bilimsel veri sunmaktadır.

Olgunlaşma süresinin ilerlemesi ile biyoaktif peptid sayısının ve çeşitliliğinin artmasından dolayı uzun süre olgunlaştırılan tulum peynirlerinin sağlık açısından tüketiminin daha yararlı olduğu düşünülmektedir. Biyoaktif peptid çeşidinin ve sayısının daha fazla olarak belirlendiği Ereğli yöresine ait tulum peynirlerinin sağlık açısından daha fazla tüketilmesi önerilebilir. Biyoaktif peptid sayısı bakımından bu yöreyi Karaman yöresine ait tulum peynirleri takip etmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, online veri tabanlarında fonksiyonel özellikleri belirlenmeyen peptidler kromatografik yöntemlerle tulum peynirlerinden izole edilerek veya sentetik olarak sentezlettirilerek bu peptidlerin çeşitli fonksiyonel özellikleri sonraki çalışmalarda incelenebilir.

Olgunlaşma süresinin peptid sayısı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sonraki çalışmalarda daha uzun olgunlaşma sürelerinin peptid profili üzerine etkisi araştırılabilir. Bu çalışmada, suda çözünebilir ekstraktlarda bulunan peptidler incelenmiştir. Ayrıca, ileriki çalışmalarda pH 4.4'te çözünebilir, %12'lik trikloroasetik asitte çözünebilir, fosfotungustik asitte çözünebilir ve etanolde çözünebilir peptidler de karakterize edilerek bu farklı çözücülerdeki peptid profili karşılaştırılabilir. Ayrıca, olgunlaşma süresince peptidlerin meydana gelme ve parçalanma kinetiğini daha detaylı araştırmak için ileriki çalışmalarda bu peptidlerin kantitatif analizleri de yapılarak matematiksel modellemeler uygulanabilir.

KAYNAKLAR

Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A. ve Hamad, E., 2017, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins, *International Dairy Journal*, 66, 91-98.

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. ve Itoh, T., 1998, Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion, *Journal of Dairy Science*, 81 (12), 3131-3138.

Akın, N., 2010, Temel peynir bilimi-I: Temel konular. Konya, Damla Ofset.

Alewijn, M., Sliwinski, E. ve Wouters, J., 2005, Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese, *International Dairy Journal*, 15 (6-9), 733-740.

Alli, I., Okoniewska, M., Gibbs, B. ve Konishi, Y., 1998, Identification of peptides in Cheddar cheese by electrospray ionization mass spectrometry, *International Dairy Journal*, 8 (7), 643-649.

Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jensen, E., Jacobsen, M., Langsrud, T. ve Vegarud, G. E., 2011, Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice, *British Journal of Nutrition*, 106 (6), 896-905.

Alonso, L., Juarez, M., Ramose, M. ve Martin-Alvarez, P. J., 1987, Overall composition, nitrogen fractions and fat characteristics of Cabrales cheese during ripening, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 185 (6), 481-486.

Altmann, K., Wutkowski, A., Klempt, M., Clawin-Rädecker, I., Meisel, H. ve Lorenzen, P. C., 2016, Generation and identification of anti-inflammatory peptides from bovine β-casein using enzyme preparations from cod and hog, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (3), 868-877.

Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Considine, K. ve Hill, C., 2013, Structure-activity relationship of synthetic variants of the milkderived antimicrobial peptide α_{s2}-casein f(183–207), *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (11), 5179-5185.

Andersen, L. T., Ardö, Y. ve Bredie, W. L., 2010, Study of taste-active compounds in the water-soluble extract of mature Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 20 (8), 528-536.

Ardö, Y., 1999, Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions, *International Dairy Federation*, Bulletin 337, 4-9.

Ardö, Y., Lilbaek, H., Kristiansen, K., Zakora, M. ve Otte, J., 2007, Identification of large phosphopeptides from β-casein that characteristically accumulate during ripening of the semi-hard cheese Herrgård, *International Dairy Journal*, 17 (5), 513-524.

Ardö, Y., McSweeney, P. L., Magboul, A. A., Upadhyay, V. K. ve Fox, P. F., 2017, Biochemistry of cheese ripening: proteolysis, In: Cheese, Eds: Paul L.H. McSweeney, P. F. F., Paul D. Cotter and David W. Everett, Fourth edition: Elsevier, p. 445-482.

Argumosa, O., Carballo, J., Bernardo, A. ve Martin, R., 1992, Chemical characterization of a Spanish artisanal goat cheese (Babia-Laciana variety), *MAN Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 10 (1), 69-76.

Arslaner, A., 2008, Geleneksel yöntem ve farklı sütlerden ısıl İşlem uygulanarak üretilen ve farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırılan erzincan tulum peynirinde bazı kalite niteliklerinin tespiti, Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 165.

Asano, M., Nio, N. ve Ariyoshi, Y., 1992, Inhibition of prolyl endopeptidase by synthetic β-casein peptides and their derivatives with a C-terminal prolinol or prolinal, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56 (6), 976-977.

Aslam, M. Z., Shoukat, S., Hongfei, Z. ve Bolin, Z., 2018, Peptidomic analysis of ACE inhibitory peptides extracted from fermented goat milk, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1-12.

Aslam, M. Z., Aslam, M. S., Firdos, S., Ghous, G., Firdos, G., Hongfei, Z. ve Bolin, Z., 2019, Role of bioactive peptides in reducing the severity of hypertension with the inhibition of ACE, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1-11.

Atasoy, A. F. ve Türkoğlu, H., 2009, Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening, *Food Chemistry*, 115 (1), 71-78.

Baankreis, R. ve Exterkate, F. A., 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, *Systematic and Applied Microbiology*, 14 (4), 317-323.

Balthazar, C., Pimentel, T., Ferrão, L., Almada, C., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A., Nascimento, J. S. ve Silva, M., 2017, Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16 (2), 247-262.

Bamdad, F., Shin, S. H., Suh, J.-W., Nimalaratne, C. ve Sunwoo, H., 2017, Anti-Inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes, *Molecules*, 22 (4), 609.

Bansal, N., Fox, P. F. ve McSweeney, P. L., 2007, Factors affecting the retention of rennet in cheese curd, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22), 9219-9225.

Barać, M. B., Smiljanić, M., Pešic, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. T. ve Maćej, O. D., 2013, Primary proteolysis of white brined goat cheese monitored by high molarity Tris buffer SDS-PAGE system, *Mljekarstvo*, 63 (3), 122-131.

Bastian, E., Lo, C. ve David, K., 1997, Plasminogen activation in cheese milk: Influence on Swiss cheese ripening, *Journal of Dairy Science*, 80 (2), 245-251.

Baum, F., Fedorova, M., Ebner, J., Hoffmann, R. ve Pischetsrieder, M., 2013, Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides, *Journal of Proteome Research*, 12 (12), 5447-5462.

Bayar, N., 2008, Farklı ambalaj materyallerinin tulum peynirinin çeşitli kalite özellikleri üzerine etkisi, Doktora tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van.

Benavente, F., Pero-Gascon, R., Pont, L., Jaumot, J., Barbosa, J. ve Sanz-Nebot, V., 2018, Identification of antihypertensive peptides in nutraceuticals by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1579, 129-137.

Bezerra, V. S., Campos, J. F., Silva, R. A. d., Porto, T. S., Lima Filho, J. L. d. ve Porto, A. L. F., 2013, Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (Capra hircus Linnaeus, 1758) obtained by papain action, *Food Science and Technology*, 33 (3), 513-520.

Bhat, M. Y., Dar, T. A. ve Singh, L. R., 2016, Casein proteins: Structural and functional aspects, In: Milk proteins–from structure to biological properties and health aspects, Eds: Gigli, I., *Rijeka*: IntechOpen, p. 1-17.

Birkemo, G., O'Sullivan, O., Ross, R. ve Hill, C., 2009, Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum, *Journal of Applied Microbiology*, 106 (1), 233-240.

Bonomi, F., Brandt, R., Favalli, S., Ferranti, P., Fierro, O., Frøkiær, H., Ragg, E. ve Iametti, S., 2011, Structural determinants of the immunomodulatory properties of the C-terminal region of bovine β-casein, *International Dairy Journal*, 21 (10), 770-776.

Boots, J.-W. P., 2009, Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use, Google Patents.

Boots, J.-W. P., 2012, Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use, Google Patents.

Boots, J.-W. P., 2013, Methods for stimulating glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion and treatments comprising same, Google Patents.

Børsting, M. W., Qvist, K. B., Rasmussen, M., Vindeløv, J., Vogensen, F. K. ve Ardö, Y., 2012, Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese, *Dairy Science & Technology*, 92 (5), 593-612.

Børsting, M. W., Qvist, K. B. ve Ardö, Y., 2014, Influence of pH on retention of camel chymosin in curd, *International Dairy Journal*, 38 (2), 133-135.

Bounouala, F. Z., Roudj, S., Karam, N.-E., Recio, I. ve Miralles, B., 2017, Casein hydrolysates by *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* proteases: Peptide profile discriminates strain-dependent enzyme specificity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (42), 9324-9332.

Broadbent, J. R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M. E. ve Steele, J. L., 2002, Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4), 1778-1785.

Cadee, J. A. ve Mallee, L. F., 2010, Peptides inhibiting angiotensin-converting enzyme, Google Patents.

Carles, C. ve Dumas, B. R., 1985, Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine α_{s1}-casein: Comparison of the behaviour of this substrate with that of β-and κ_o-caseins, *FEBS Letters*, 185 (2), 282-286.

Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P. ve Sampelayo, M. R. S., 2009, Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (4), 322-329.

Centeno, J., Rodrigez-Otero, J. ve Cepeda, A., 1994, Changes in the protein profile of Arzua cheese (NW Spain) during ripening, *Milchwissenschaft*, 49 (6), 319-322.

Chalmers, M. J., Kolch, W., Emmett, M. R., Marshall, A. G. ve Mischak, H., 2004, Identification and analysis of phosphopeptides, *Journal of Chromatography B*, 803 (1), 111-120.

Chang, O. K., Seol, K. H., Jeong, S. G., Oh, M. H., Park, B. Y., Perrin, C. ve Ham, J. S., 2013, Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom, *Journal of Dairy Science*, 96 (9), 5544-5555.

Chang, O. K., Roux, É., Awussi, A. A., Miclo, L., Jardin, J., Jameh, N., Dary, A., Humbert, G. ve Perrin, C., 2014, Use of a free form of the *Streptococcus thermophilus* cell envelope protease PrtS as a tool to produce bioactive peptides, *International Dairy Journal*, 38 (2), 104-115.

Charalambides, M., Williams, J. ve Chakrabarti, S., 1995, A study of the influence of ageing on the mechanical properties of Cheddar cheese, *Journal of Materials Science*, 30 (16), 3959-3967.

Chavagnat, F., Casey, M. G. ve Meyer, J., 1999, Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilu*s A, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7), 3001-3007.

Chaves, W. V. ve Grosso, C., 1999, Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage, *Journal of food science*, 64 (2), 202-205.

Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A. ve Steele, J. L., 1999, Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (1-4), 217-246.

Chrzanowska, J., Kolaczkowska, M., Dryjański, M., Stachowiak, D. ve Polanowski, A., 1995, Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties, and substrate specificity, *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (8), 719-724.

Cichoscki, A. J., Valduga, E., Valduga, A. T., Tornadijo, M. a. E. ve Fresno, J. M., 2002, Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening, *Food Control*, 13 (4-5), 329-336.

Creamer, L., Lawrence, R. ve Gilles, J., 1985, Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 20, 185-203.

Curtin, Á. C., Gobbetti, M. ve McSweeney, P., 2002, Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 76 (3), 231-240.

Çakır, Y. ve Çakmakçı, S., 2018, Some microbiological, physicochemical and ripening properties of Erzincan Tulum cheese produced with added black cumin (*Nigella sativa* L.), *Journal of Food Science and Technology*, 55 (4), 1435-1443.

Çalım, H. D., 2007, Konya ve çevresinde farklı tip ambalajlarda tüketime sunulan tulum peynirlerinin kalite nitelikleri, Doktora tezi, *Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 130.

Dalsgaard, T. K., Heegaard, C. W. ve Larsen, L. B., 2008, Plasmin digestion of photooxidized milk proteins, *Journal of Dairy Science*, 91 (6), 2175-2183.

De Gobba, C., Espejo-Carpio, F. J., Skibsted, L. H. ve Otte, J., 2014, Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases, *International Dairy Journal*, 39 (1), 28-40.

de Palencia, P. F., de Felipe, F. L., Requena, T. ve Peláez, C., 2000, The aminopeptidase C (PepC) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. A comparative study of PepC from lactic acid bacteria, *European Food Research and Technology*, 212 (1), 89-94.

De Simone, C., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Chianese, L., Addeo, F. ve Ferranti, P., 2009, Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey, *Journal*

of peptide science: an official publication of the European Peptide Society, 15 (3), 251-258.

Debruyne, D., Oliveira, M. J., Bracke, M., Mareel, M. ve Leroy, A., 2006, Colon cancer cells: pro-invasive signalling, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (8), 1231-1236.

del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. ve Recio, I., 2009, Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity, *International Dairy Journal*, 19 (10), 566-573.

del Mar Contreras, M., Sanchez, D., Sevilla, M. Á., Recio, I. ve Amigo, L., 2013, Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion, *International Dairy Journal*, 32 (2), 71-78.

Demirci, T., 2019, Orta toroslar yöresinde geleneksel yöntemlerle üretilen deri tulum peynirlerinin olgunlaşma periyodu boyunca mikrobiyal kompozisyonlarının belirlenmesi, Doktora tezi, *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 139.

Deutsch, S.-M., Molle, D., Gagnaire, V., Piot, M., Atlan, D. ve Lortal, S., 2000, Hydrolysis of sequenced β-casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12), 5360-5367.

Di Pierro, G., O'Keeffe, M. B., Poyarkov, A., Lomolino, G. ve FitzGerald, R. J., 2014, Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase, *Food Chemistry*, 156, 305-311.

Diezhandino, I., Fernández, D., González, L., McSweeney, P. ve Fresno, J., 2015, Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese), *Food Chemistry*, 168, 134-141.

Durlu-Özkaya, F. ve Gün, İ., 2007, Anadolu'da peynir kültürü, *ICANAS*, 38, 10-15.

Egito, A. S., Girardet, J. M., Poirson, C., Mollé, D., Humbert, G., Miclo, L. ve Gaillard, J. L., 2003, Action of plasmin on equine β-casein, *International Dairy Journal*, 13 (10), 813-820.

El-Shafei, H., El-Soda, M. ve Ezzat, N., 1990, The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*, *Journal of Food Protection*, 53 (2), 165-169.

El Soda, M., Said, H., Desmazeaud, M., Mashaly, R. ve Ismail, A., 1983, The intracellular peptide-hydrolases of *Lactobacillus plantarum.* Comparison with *Lactobacillus casei*, *Le Lait*, 63 (623-624), 1-14.

Elkhtab, E., El-Alfy, M., Shenana, M., Mohamed, A. ve Yousef, A. E., 2017, New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures, *Journal of Dairy Science*, 100 (12), 9508-9520.

Eren Karahan, L., 2016, Farklı oran ve üretim aşamalarında mikrobiyal transglutaminaz ilavesinin yarım yağlı beyaz peynirin özellikleri üzerine etkisi, Doktora tezi, *Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Şanlıurfa.

Espejo-Carpio, F. J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E. M. ve Otte, J., 2013, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions, *International Dairy Journal*, 32 (2), 175-183.

Exterkate, F. A., Alting, A. C. ve Slangen, C. J., 1991, Specificity of two genetically related cell-envelope proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* towards α_{s1}-casein-(1–23)-fragment, *Biochemical Journal*, 273 (1), 135-139.

Fan, M., Guo, T., Li, W., Chen, J., Li, F., Wang, C., Shi, Y., Li, D. X.-a. ve Zhang, S., 2019, Isolation and identification of novel casein-derived bioactive peptides and potential functions in fermented casein with *Lactobacillus helveticus*, *Food Science and Human Wellness*, 8 (2), 156-176.

Farkye, N. ve Fox, P. F., 1992, Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin, *Journal of Dairy Research*, 59 (2), 209-216.

Farkye, N. Y. ve Fox, P. F., 1990, Observations on plasmin activity in cheese, *Journal of Dairy Research*, 57 (3), 413-418.

Farkye, N. Y., 2004, Cheese technology, *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2-3), 91-98.

Farrell, H., Qi, P., Brown, E., Cooke, P., Tunick, M., Wickham, E. ve Unruh, J., 2002, Molten globule structures in milk proteins: implications for potential new structure-function relationships, *Journal of Dairy Science*, 85 (3), 459-471.

Farvin, K. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J. ve Jacobsen, C., 2010, Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2–characterisation of peptide fractions, *Food Chemistry*, 123 (4), 1090-1097.

Fatchiyah, F. ve Natasia, S. C., 2018, Inhibition potency of HMGR enzyme against hypercholesterolemia by bioactive peptides of CSN1S2 protein from caprine milk, *AIP Conference Proceedings*, 070014.

Fenster, K. M., Parkin, K. L. ve Steele, J. L., 1997, Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, *Journal of Bacteriology*, 179 (8), 2529-2533.

Fernandez-Espla, M. ve Fox, P., 1997, Purification and characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Propionibacterium shermanii* NCDO 853, *International Dairy Journal*, 7 (1), 23-29.

Fernández, M., Singh, T. K. ve Fox, P. F., 1998, Isolation and identification of peptides from the diafiltration permeate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (11), 4512-4517.

Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Júnior, M. J. M., Baracat-Pereira, M. C., Piccoli, R. H. ve de Abreu, L. R., 2018, Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese, *Food Research International*, 107, 406-413.

Fontenele, M. A., do SR Bastos, M., dos Santos, K. M., Bemquerer, M. P. ve do Egito, A. S., 2017, Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO), *Food Chemistry*, 219, 382-390.

Forde, A. ve Fitzgerald, G. F., 2000, Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour, *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (5), 484-489.

Fox, P., 1988, Acceleration of cheese ripening, *Food Biotechnology*, 2 (2), 133-185.

Fox, P., Singh, T. ve McSweeney, P., 1994, Proteolysis in cheese during ripening, In: Biochemistry of Milk Products, Eds: Andrews, A. T., Varley, J. , *Cambridge*: Royal Society of Chemistry, p. 1-31.

Fox, P. ve McSweeney, P., 1996, Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International*, 12 (4), 457-509.

Fox, P. ve McSweeney, P., 1997, Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening, In: Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, Eds: Springer, p. 1-49.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. ve McSweeney, P. L. H., 2017, Biochemistry of cheese ripening, In: Fundamentals of cheese science, Eds: Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. ve McSweeney, P. L. H., *Boston, MA*: Springer US, p. 391-442.

Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M. ve Léonil, J., 2001, Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (9), 4402-4413.

Gagnaire, V., Carpino, S., Pediliggieri, C., Jardin, J., Lortal, S. ve Licitra, G., 2011, Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of Ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (23), 12443-12452.

Gaya, P., Sánchez, C., Nunez, M. ve Fernández-García, E., 2005, Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation, *Journal of Dairy Research*, 72 (3), 287-295.

Geerlings, A., Villar, I., Zarco, F. H., Sánchez, M., Vera, R., Gomez, A. Z., Boza, J. ve Duarte, J., 2006, Identification and characterization of novel angiotensin-converting enzyme inhibitors obtained from goat milk, *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3326-3335.

Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Van Driessche, G., Alexandraki, V., Anastasiou, R., Papadelli, M., Kazou, M., Manolopoulou, E. ve Kletsas, D.,

2017, Evaluation of the antihypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity and other probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products, *International Dairy Journal*, 75, 10-21.

Georgalaki, M. D., Papdelli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos, G. ve Tsakalidou, E., 2002, Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the pepX gene, *Le Lait*, 82 (6), 657-671.

Giacometti, J. ve Buretić-Tomljanović, A., 2017, Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides, *Food Chemistry*, 230, 91-98.

Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B. ve Portalier, R., 1994, Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: purification and characterization, *Microbiology*, 140 (3), 537-542.

Gobbetti, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A. ve De Angelis, M., 1997, Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening, *International Dairy Journal*, 7 (8-9), 519-529.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. ve Addeo, F., 2000, Production of Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 3898-3904.

Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M. ve Recio, I., 2002, Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures, *International Dairy Journal*, 12 (8), 697-706.

Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M. ve Recio, I., 2004, Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1054 (1-2), 269-277.

Gómez-Ruiz, J. Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I. ve Ramos, M., 2006, Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry, *European Food Research and Technology*, 223 (5), 595-601.

Gómez-Ruiz, J. Á., Taborda, G., Amigo, L., Ramos, M. ve Molina, E., 2007, Sensory and mass spectrometric analysis of the peptidic fraction lower than one thousand daltons in Manchego cheese, *Journal of Dairy Science*, 90 (11), 4966-4973.

Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M. ve Recio, I., 2007, Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques, *Electrophoresis*, 28 (22), 4202-4211.

González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J. M. ve Tornadijo, M. E., 2010, Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese, *Food Microbiology*, 27 (5), 592-597.

Gorouhi, F. ve Maibach, H., 2009, Role of topical peptides in preventing or treating aged skin, *International Journal of Cosmetic Science*, 31 (5), 327-345.

Gouldsworthy, A. M., Leaver, J. ve Banks, J. M., 1996, Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 6 (8-9), 781-790.

Göncü, A., Alpkent, Z. ve Milci, S., 2004, Çörekotlu tulum çökeleklerinin (Çoban tulumu) kimyasal kompozisyonu ve mikrobiyel kalitesinin araştırılması. *II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*. Van.

Green, M. L. ve Foster, P., 1974, Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants, *Journal of Dairy Research*, 41 (2), 269-282.

Gripon, J., 1993, Mould-ripened cheeses, In: Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Eds: Springer, p. 111-136.

Guinee, T., 2004, Salting and the role of salt in cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2-3), 99-109.

Gútiez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C. ve Hernández, P. E., 2013, *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk, *International Journal of Food Microbiology*, 166 (1), 93-101.

Güler, S. ve Demir Önal, E., 2015, Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) analogları, *Turkiye Klinikleri Endocrinology-Special Topics*, 8 (2), 76-81.

Gün, İ., 2012, Alternatif kilif uygulamalarinin tulum peynrinin bazi nitelikleri üzerine etkileri, Doktora tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 259.

Gürsoy, O., 2005, Bazı probiyotik bakterilerin destek kültür olarak beyaz peynir üretiminde kullanımı, Doktora tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* İzmir, 258.

Ha, G. E., Chang, O. K., Han, G. S., Ham, J. S., Park, B.-Y. ve Jeong, S.-G., 2015, Comparison of antioxidant activities of hydrolysates of domestic and imported skim milk powders treated with papain, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (3), 360.

Habibi-Najafi, M. B. ve Lee, B. H., 1995, Purification and characterization of proline iminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG, *Journal of Dairy Science*, 78 (2), 251-259.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C. l., Girardet, J.-M., Lecomte, X., Paris, C., Galia, W., Dary, A. ve Miclo, L., 2015, New insights into the proteolytic system of *Streptococcus*

thermophilus: use of isracidin to characterize cell-associated extracellular peptidase activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (34), 7522-7531.

Hannon, J., Wilkinson, M., Delahunty, C., Wallace, J., Morrissey, P. ve Beresford, T., 2003, Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 13 (4), 313-323.

Haque, E., Chand, R. ve Kapila, S., 2008, Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin, *Food Reviews International*, 25 (1), 28-43.

Hartmann, R. ve Meisel, H., 2007, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2), 163-169.

Hayaloglu, A. A., Fox, P. F., Guven, M. ve Cakmakci, S., 2007, Cheeses of Turkey: 1. Varieties ripened in goat-skin bags, *Le Lait*, 87 (2), 79-95.

Hayaloğlu, A., 2008, Türkiye'nin peynirleri-Genel bir perspektif, *Türkiye*, 10, 21-23.

Hayes, M., Ross, R., Fitzgerald, G., Hill, C. ve Stanton, C., 2006, Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3), 2260-2264.

Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. ve Ross, R. P., 2007a, Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2 (4), 435-449.

Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G. ve Ross, R., 2007b, Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4658-4667.

Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. ve Recio, I., 2005, Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (6), 1041-1048.

Herreros, M., Fresno, J., Prieto, M. G. ve Tornadijo, M., 2003, Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese), *International Dairy Journal*, 13 (6), 469-479.

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. ve Chi, L., 2008, The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs?, *Peptides*, 29 (6), 1062-1071.

Huang, G.-Q., Xiao, J.-X., Hao, L.-Q. ve Yang, J., 2017, Microencapsulation of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide VLPVP by membrane emulsification, *Food and Bioprocess Technology*, 10 (11), 2005-2012.

Hurley, M., Larsen, L., Kelly, A. ve McSweeney, P., 2000, The milk acid proteinase cathepsin D: a review, *International Dairy Journal*, 10 (10), 673-681.

Igoumenidou, V., Lambropoulos, I., Roussou, I. ve Roussis, I., 2005, Casein and cheese peptide degradation by *Enterococcus duran*s FC12 isolated from Feta cheese, *Food Biotechnology*, 19 (2), 161-172.

Irlinger, F., Helinck, S. ve Jany, J. L., 2017, Secondary and adjunct cultures, In: Cheese, Eds, Fourth edition: Elsevier, p. 273-300.

Ivens, K. O., Baumert, J. L., Hutkins, R. L. ve Taylor, S. L., 2017, Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA, *Journal of Dairy Science*, 100 (3), 1629-1639.

Jensen, M. P., Vogensen, F. K. ve Ardö, Y., 2009, Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus s*trains, *International Dairy Journal*, 19 (11), 661-668.

Jin, Y. K. ve Park, Y. W., 1996, SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions, *Journal of Food Science*, 61 (3), 490-495.

Jinsmaa, Y. ve Yoshikawa, M., 1999, Enzymatic release of neocasomorphin and β-casomorphin from bovine β-casein, *Peptides*, 20 (8), 957-962.

Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J.-C. ve Richard, J., 1995, Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8), 3024-3030.

Juillerat-Jeanneret, L., Robert, M.-C. ve Juillerat, M. A., 2010, Peptides from *Lactobacillus* hydrolysates of bovine milk caseins inhibit prolyl-peptidases of human colon cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (1), 370-377.

Kandarakis, I., Moatsou, G., Georgala, A., Kaminarides, S. ve Anifantakis, E., 2001, Effect of draining temperature on the biochemical characteristics of Feta cheese, *Food Chemistry*, 72 (3), 369-378.

Karaca, O. B., 2007, Mikrobiyel kaynaklı proteolitik ve lipolitik enzim kullanımının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşmaları üzerine etkileri, Doktora tezi, *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana 149.

Kariyama, R., Massidda, O., Daneo-Moore, L. ve Shockman, G., 1990, Properties of cell wall-associated DD-carboxypeptidase of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecium*) ATCC 9790 extracted with alkali, *Journal of Bacteriology*, 172 (7), 3718-3724.

Khalid, N. M. ve Marth, E. H., 1990, Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*, *Journal of Dairy Science*, 73 (11), 3068-3076.

Klein, N., Zourari, A. ve Lortal, S., 2002, Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products—comparison with several dairy bacteria, *International Dairy Journal*, 12 (10), 853-861.

Kliche, T., Li, B., Bockelmann, W., Habermann, D., Klempt, M., de Vrese, M., Wutkowski, A., Clawin-Raedecker, I. ve Heller, K., 2017, Screening for proteolytically active lactic acid bacteria and bioactivity of peptide hydrolysates obtained with selected strains, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (20), 7621-7633.

Kohmura, M., Nio, N. ve Ariyoshi, Y., 1990, Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of various β-caseins, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (4), 1101-1102.

Korhonen, H., 2009, Milk-derived bioactive peptides: From science to applications, *Journal of Functional Foods*, 1 (2), 177-187.

Kruzel, M. L., 2011, Therapeutic use of peptides, Google Patents.

Kurt, A., Çakmakçı, S. ve Çağlar, A., 1993, Süt ve mamülleri muayene ve analiz metodları rehberi, 252/d, *Erzurum*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, p. 238.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259), 680.

Lahov, E. ve Regelson, W., 1996, Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides, *Food and Chemical Toxicology*, 34 (1), 131-145.

Larsen, L. B., Benfeldt, C., Rasmussen, L. K. ve Petersen, T. E., 1996, Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation, *Journal of Dairy Research*, 63 (1), 119-130.

Larsson, M., Zakora, M., Dejmek, P. ve Ardö, Y., 2006, Primary proteolysis studied in a cast cheese made from microfiltered milk, *International Dairy Journal*, 16 (6), 623-632.

Law, J. ve Haandrikman, A., 1997, Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 7 (1), 1-11.

Lee, H. S. ve Lee, K. J., 2000, Cathepsin B inhibitory peptides derived from β-casein, *Peptides*, 21 (6), 807-809.

Lin, K., Zhang, L.-w., Han, X. ve Cheng, D.-y., 2017, Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study, *Journal of Functional Foods*, 32, 266-277.

Losito, I., Carbonara, T., De Bari, M. D., Gobbetti, M., Palmisano, F., Rizzello, C. G. ve Zambonin, P. G., 2006, Identification of peptides in antimicrobial fractions of cheese extracts by electrospray ionization ion trap mass spectrometry coupled to a two-dimensional liquid chromatographic separation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (3), 447-455.

Lozo, J., Strahinic, I., Dalgalarrondo, M., Chobert, J.-M., Haertlé, T. ve Topisirovic, L., 2011, Comparative analysis of β-casein proteolysis by PrtP proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, PrtR proteinase from *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 and PrtH proteinase from *Lactobacillus helveticus* BGRA43, *International Dairy Journal*, 21 (11), 863-868.

Lund, M. ve Ardö, Y., 2004, Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe (III) affinity chromatography and mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), 6616-6622.

Macedo, A. C., Vieira, M., Poças, R. ve Malcata, F. X., 2000, Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese, *International Dairy Journal*, 10 (11), 769-774.

Mahdi, C., Untari, H. ve Padaga, P., 2017, Fermented goat milk supplementation in rats hypercholesterolmic on malonyldialdehyde and description of liver histopathology, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8 (1), 1-8.

Mahdi, C., Untari, H. ve Padaga, M. C., 2018, Identification and characterization of bioactive peptides of fermented goat milk as a sources of antioxidant as a therapeutic natural product, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1-6.

Mane, A., Ciocia, F., Beck, T., Lillevang, S. ve McSweeney, P. L., 2019, Proteolysis in Danish blue cheese during ripening, *International Dairy Journal*, 97, 191-200.

Manguy, J. ve Shields, D. C., 2019, Implications of kappa-casein evolutionary diversity for the self-assembly and aggregation of casein micelles, *Royal Society Open Science*, 6 (10), 1-17.

McNair, L. K., Siedler, S., Vinther, J. M., Hansen, A. M., Neves, A. R., Garrigues, C., Jäger, A. K., Franzyk, H. ve Staerk, D., 2018, Identification and characterization of a new antifungal peptide in fermented milk product containing bioprotective *Lactobacillus* cultures, *FEMS Yeast Research*, 18 (8), 1-9.

McSweeney, P. ve Fox, P., 1997, Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening, *Le Lait*, 77 (1), 41-76.

McSweeney, P., 2004, Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview, In: Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Eds: Fox, P. F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., *London, UK*: Academic Press, p. 347-360.

McSweeney, P. L., Olson, N. F., Fox, P. F. ve Healy, Á., 1994, Proteolysis of bovine α_{s2}-casein by chymosin, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199 (6), 429-432.

McSweeney, P. L., Fox, P. ve Olson, N., 1995, Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin, *International Dairy Journal*, 5 (4), 321-336.

Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S. ve Brandelli, A., 2012, Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay, *Food Research International*, 48 (1), 322-329.

Meisel, H., 1998, Overview on milk protein-derived peptides, *International dairy journal*, 8 (5-6), 363-373.

Meisel, H. ve Bockelmann, W., 1999, Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (1-4), 207-215.

Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D. ve Sieber, R., 2009, Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties, *Journal of Dairy Science*, 92 (3), 826-836.

Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A. ve Zerfiridis, G. K., 1998, Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese, *Journal of Dairy Science*, 81 (12), 3109-3116.

Miclo, L., Roux, E. m., Genay, M., Brusseaux, E. m., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C. ve Dary, A., 2012, Variability of hydrolysis of β-, α_{s1}-, and α_{s2}-caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2), 554-565.

Mierau, I., Tan, P., Haandrikman, A. J., Mayo, B., Kok, J., Leenhouts, K. J., Konings, W. N. ve Venema, G., 1993, Cloning and sequencing of the gene for a lactococcal endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase, *Journal of Bacteriology*, 175 (7), 2087-2096.

Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. ve Aleixandre, M., 2006, Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats, *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3352-3359.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C., Fox, P., Monnet, V. ve Gobbetti, M., 2003, Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species, *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9), 5297-5305.

Moatsou, G., Moschopoulou, E., Georgala, A., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S. ve Anifantakis, E., 2004, Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese, *Food Chemistry*, 88 (4), 517-525.

Mohanty, D., Mohapatra, S., Misra, S. ve Sahu, P., 2016, Milk derived bioactive peptides and their impact on human health–A review, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23 (5), 577-583.

Møller, K. K., Rattray, F. P. ve Ardö, Y., 2012, Camel and bovine chymosin hydrolysis of bovine α_{S1}-and β-caseins studied by comparative peptide mapping, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (45), 11421-11432.

Monnet, V., Nardi, M., Chopin, A., Chopin, M.-C. ve Gripon, J.-C., 1994, Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (51), 32070-32076.

Mooney, J., Fox, P., Healy, A. ve Leaver, J., 1998, Identification of the principal water-insoluble peptides in Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 8 (9), 813-818.

Moreno-Montoro, M., Jauregi, P., Navarro-Alarcón, M., Olalla-Herrera, M., Giménez-Martínez, R., Amigo, L. ve Miralles, B., 2018, Bioaccessible peptides released by in vitro gastrointestinal digestion of fermented goat milks, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (15), 3597-3606.

Morul, F., 2011, Divle tulum peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Van, 98.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N. ve Schrezenmeir, J., 2008, Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects, *European Journal of Nutrition*, 47 (4), 171-182.

Muller-Renaud, S., Dupont, D. ve Dulieu, P., 2004, Quantification of β-casein in milk and cheese using an optical immunosensor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4), 659-664.

Mulvihill, D. ve Fox, P., 1979, Proteolytic specificity of chymosins and pepsins on caseins, *Milchwissenschaft*, 34, 680-683.

Nath, K. ve Ledford, R., 1972, Caseinolytic activity of micrococci isolated from Cheddar cheese, *Journal of Dairy Science*, 55 (10), 1424-1427.

Nguyen, D. D., Johnson, S. K., Busetti, F. ve Solah, V. A., 2015, Formation and degradation of beta-casomorphins in dairy processing, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (14), 1955-1967.

Nongonierma, A. B. ve FitzGerald, R. J., 2014, Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis, *Food Chemistry*, 145, 845-852.

Nongonierma, A. B. ve FitzGerald, R. J., 2016, Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity, *Peptides*, 79, 1-7.

Nongonierma, A. B., Lalmahomed, M., Paolella, S. ve FitzGerald, R. J., 2017a, Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides, *Food Chemistry*, 231, 202-211.

Nongonierma, A. B., Mazzocchi, C., Paolella, S. ve FitzGerald, R. J., 2017b, Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis, *Food Research International*, 94, 79-89.

Nuñez, M., Guillén, A., Rodríguez-Marín, M., Marcilla, A., Gaya, P. ve Medina, M., 1991, Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of neutral proteinases, *Journal of Dairy Science*, 74 (12), 4108-4118.

O'Farrell, I. P., Sheehan, J. J., Wilkinson, M. G., Harrington, D. ve Kelly, A. L., 2002, Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese, *Le Lait*, 82 (3), 305-316.

O'Halloran, F., Bruen, C., McGrath, B., Schellekens, H., Murray, B., Cryan, J. F., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. ve Giblin, L., 2018, A casein hydrolysate increases GLP-1 secretion and reduces food intake, *Food Chemistry*, 252, 303-310.

O'Regan, J., Ennis, M. ve Mulvihill, D., 2009, Milk proteins, In: Handbook of hydrocolloids, Eds: Williams, G. O. P. a. P. A.: Elsevier, p. 298-358.

Ohsawa, K., Uchida, N., Ohki, K. ve Goto, H., 2013, Composition for improving brain function and method for improving brain function, Google Patents.

Ohsawa, K., Nakamura, F., Uchida, N., Mizuno, S. ve Yokogoshi, H., 2018a, *Lactobacillus helveticus*-fermented milk containing lactononadecapeptide (NIPPLTQTPVVVPPFLQPE) improves cognitive function in healthy middle-aged adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69 (3), 369-376.

Ohsawa, K., Uchida, N., Ohki, K. ve Yokogoshi, H., 2018b, Identification of peptides present in sour milk whey that ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 69 (1), 33-45.

Ong, L., Henriksson, A. ve Shah, N. P., 2007, Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp, *International Dairy Journal*, 17 (1), 67-78.

Otte, J., Ardö, Y., Weimer, B. ve Sørensen, J., 1999, Capillary electrophoresis used to measure proteolysis in cheese, *International Dairy Federation*, Bulletin 337, 10-16.

Ozcan, T. ve Kurdal, E., 2012, The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 65 (4), 585-593.

Öztürk, H. İ., 2015, Geleneksel yöntemle üretilen tulum peynirlerinin bazi kalite özelliklerinin, biyoaktif peptid içeriklerinin ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 160.

Öztürk, H. İ. ve Akin, N., 2018, Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening, *Food Science and Technology*, 38 (4), 674-682.

Öztürkoğlu, Ş., 2014, Divle Obruk peynirinin bazı özelliklerinin belirlenmesi, Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 245.

Pan, D. ve Tanokura, M., 2004, Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* JCM 1004, *Food Chemistry*, 88 (4), 511-516.

Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A.-M., Malcata, F. X. ve Alichanidis, E., 2007, Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, *Food Chemistry*, 105 (2), 647-656.

Park, Y., Juárez, M., Ramos, M. ve Haenlein, G., 2007, Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), 88-113.

Pastorino, A., Hansen, C. ve McMahon, D. J., 2003, Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of Cheddar cheese, *Journal of Dairy Science*, 86 (9), 2751-2760.

Pecka-Kiełb, E., Zachwieja, A., Wojtas, E. ve Zawadzki, W., 2018, Influence of nutrition on the quality of colostrum and milk of ruminants, *Mljekarstvo*, 68 (3), 169-181.

Perotti, M., Bernal, S., Meinardi, C. ve Zalazar, C., 2005, Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters, *International Dairy Journal*, 15 (11), 1150-1155.

Picon, A., Gaya, P., Medina, M. ve Nunez, M., 1995, The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening, *Journal of Dairy Science*, 78 (6), 1238-1247.

Pihlanto-Leppälä, A., Pahkala, E. ve Antila, V., 1993, Hydrolysis of κ-casein in solution by chymosin, plasmin, trypsin and *Lactobacillus*-proteinases, *Agricultural and Food Science*, 2 (6), 489-496.

Pihlanto, A., Virtanen, T. ve Korhonen, H., 2010, Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk, *International Dairy Journal*, 20 (1), 3-10.

Pisanu, S., Pagnozzi, D., Pes, M., Pirisi, A., Roggio, T., Uzzau, S. ve Addis, M. F., 2015, Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential, *International Dairy Journal*, 42, 26-33.

Pritchard, S. R., Phillips, M. ve Kailasapathy, K., 2010, Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese, *Food Research International*, 43 (5), 1545-1548.

Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. ve Recio, I., 2005, Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir, *Journal of Dairy Science*, 88 (10), 3480-3487.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. ve Recio, I., 2007, Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*, *International Dairy Journal*, 17 (1), 33-41.

Quirós, A., del Mar Contreras, M., Ramos, M., Amigo, L. ve Recio, I., 2009, Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β-casein-peptides with antihypertensive properties, *Peptides*, 30 (10), 1848-1853.

Rana, S., Bajaj, R. ve Mann, B., 2018, Characterization of antimicrobial and antioxidative peptides synthesized by *L. rhamnosus* C6 fermentation of milk, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24 (2), 309-321.

Rasouli, P. H., Hesari, J., Farajnia, S., Moghaddam, M. ve Ghiassifar, S., 2012, Effects of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, isolated from traditional Lighvan cheese, on physicochemical and sensory characteristics of Iranian UF white cheese, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 1023-1034.

Rattray, F. P. ve Fox, P. F., 1999, Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review, *Journal of Dairy Science*, 82 (5), 891-909.

Rauh, V. M., Johansen, L. B., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L. B. ve Hammershøj, M., 2014, Plasmin activity in UHT milk: relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (28), 6852-6860.

Raynal-Ljutovac, K., Park, Y., Gaucheron, F. ve Bouhallab, S., 2007, Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 68 (1-2), 207-220.

Reid, J., Coolbear, T., Pillidge, C. ve Pritchard, G., 1994, Specificity of hydrolysis of bovine kappa-casein by cell envelope-associated proteinases from *Lactococcus lactis* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (3), 801-806.

Requena, T., Pelaez, C. ve Fox, P. F., 1993, Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196 (4), 351-355.

Riahi, M., Trelea, I.-C., Leclercq-Perlat, M.-N., Picque, D. ve Corrieu, G., 2007, Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under controlled temperature and relative humidity, *International Dairy Journal*, 17 (8), 946-953.

Rizzello, C., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. ve Zambonin, P., 2005, Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties, *Journal of Dairy Science*, 88 (7), 2348-2360.

Robert, M.-C., Razaname, A., Mutter, M. ve Juillerat, M. A., 2004, Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (23), 6923-6931.

Rokka, T., Syväoja, E.-L., Tuominen, J. ve Korhonen, H. J., 1997, Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT-milk, *Milchwissenschaft*, 52(12), 675-678.

Roseiro, L. B., Garcia-Risco, M., Barbosa, M., Ames, J. M. ve Wilbey, R. A., 2003, Evaluation of Serpa cheese proteolysis by nitrogen content and capillary zone electrophoresis, *International Journal of Dairy Technology*, 56 (2), 99-104.

Roudot Algaron, F., 1996, The taste of amino acids, peptides and proteins: examples of tasty peptides in casein hydrolysates, *Le Lait*, 76, 313-348.

Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D. ve Prangdimurti, E., 2020, Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria, *Veterinary World*, 13 (2), 345-353.

Ruiz, J. Á. G., Ramos, M. ve Recio, I., 2004, Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion, *International Dairy Journal*, 14 (12), 1075-1080.

Sadat-Mekmene, L., Jardin, J., Corre, C., Mollé, D., Richoux, R., Delage, M.-M., Lortal, S. ve Gagnaire, V., 2011, Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* strains improves breakdown of the pure α_{s1}-casein, *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (1), 179-186.

Sadat-Mekmene, L., Richoux, R., Aubert-Frogerais, L., Madec, M.-N., Corre, C., Piot, M., Jardin, J., Le Feunteun, S., Lortal, S. ve Gagnaire, V., 2013, *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses, *Journal of Dairy Science*, 96 (3), 1455-1470.

Sagardia, I., Iloro, I., Elortza, F. ve Bald, C., 2013, Quantitative structure–activity relationship based screening of bioactive peptides identified in ripened cheese, *International Dairy Journal*, 33 (2), 184-190.

Sah, B., Vasiljevic, T., Mckechnie, S. ve Donkor, O., 2015, Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: a critical review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (2), 123-138.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. ve Itoh, T., 2000, Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese, *Journal of Dairy Science*, 83 (7), 1434-1440.

Sakaguchi, M., Murayama, K., Jinsmaa, Y., Yoshikawa, M. ve Matsumura, E., 2003, Neurite outgrowth-stimulating activities of β-casomorphins in Neuro-2a mouse

neuroblastoma cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (12), 2541-2547.

Sánchez-Rivera, L., Santos, P. F., Miralles, B., Carrón, R., Montero, M. J. ve Recio, I., 2016, Peptide fragments from β-casein f (134–138), HLPLP, generated by the action of rat blood plasma peptidases show potent antihypertensive activity, *Food Research International*, 88, 348-353.

Sanchez, I. R., Del Bosque, A. Q., Ledesma, B. H., Ruiz, J. G., Castro, M. M., Garrido, M. L. A., Exposito, I. L., Gonzalez, M. M. R., De Artiñano, A. A. ve Gómez, M. C., 2013, Bioactive peptides identified in enzymatic hydrolyzates of milk caseins and method of obtaining same, Google Patents.

Sasaki, M., Bosman, B. W. ve Tan, P. S., 1996, A new, broad-substrate-specificity aminopeptidase from the dairy organism *Lactobacillus helveticus* SBT 2171, *Microbiology*, 142 (4), 799-808.

Saurel, R., Pajonk, A. ve Andrieu, J., 2004, Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods, *Journal of Food Engineering*, 63 (2), 163-170.

Say, D., 2008, Haşlama suyunun tuz konsantrasyonu ve depolama süresinin kaşar peynirinin özellikleri üzerine etkileri, Doktora tezi, *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 131.

Schlesser, J. E., Schmidt, S. J. ve Speckman, R., 1992, Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening, *Journal of Dairy Science*, 75 (7), 1753-1760.

Seneweera, S., Anjani, K., Phillips, M. ve Kailasapathy, K., 2006, Application of encapsulated proteolytic enzyme accelerates cheese ripening, *Australian Journal of Dairy Technology*, 61 (2), 226.

Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A. ve Suzzi, G., 2010, Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese, *International Dairy Journal*, 20 (7), 459-464.

Sert, D. ve Akın, N., 2008, Türkiye'de bazı önemli tulum peyniri çeşitlerinin geleneksel üretim metotları. Türkiye 10. Gıda Kongresi**:** 717-720.

Sert, D., 2011, Geleneksel yöntemle üretilen tulum peynirlerinde kullanılan sütün orijinine bağlı olarak olgunlaşma esnasında meydana gelen bazı değişmelerin belirlenmesi, Doktora tezi, *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 222.

Sforza, S., Lambertini, F., Manzini, L., Galaverna, G., Dossena, A. ve Marchelli, R., 2011, Proteolytic peptides as molecular markers of species' authenticity in cheeses, In: Progress in Authentication of Food and Wine, Eds: ACS Publications, p. 215-226.

Sforza, S., Cavatorta, V., Lambertini, F., Galaverna, G., Dossena, A. ve Marchelli, R., 2012, Cheese peptidomics: a detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging, *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3514-3526.

Shanmugam, V., Kapila, S., Sonfack, T. K. ve Kapila, R., 2015, Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein, *International Dairy Journal*, 42, 1-5.

Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H. ve Iwan, M., 2009, Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties, *International Dairy Journal*, 19 (4), 258-263.

Silva, R. A., Bezerra, V. S., Pimentel, M. d. C. B., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H. ve Filho, J. L. L., 2016, Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal 'Coalho'cheese, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (13), 4337-4344.

Silva, S., Pihlanto, A. ve Malcata, F. X., 2006, Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*, *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3336-3344.

Singh, T., Fox, P., Højrup, P. ve Healy, A., 1994, A scheme for the fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides, *International Dairy Journal*, 4 (2), 111-122.

Singh, T. K., Fox, P. F. ve Healy, Á., 1997, Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese, *Journal of Dairy Research*, 64 (3), 433-443.

Smacchi, E. ve Gobbetti, M., 1998, Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 22 (8), 687-694.

Smacchi, E., Fox, P. F. ve Gobbetti, M., 1999, Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458, *FEMS Microbiology Letters*, 170 (2), 327-333.

Solieri, L., De Vero, L. ve Tagliazucchi, D., 2018, Peptidomic study of casein proteolysis in bovine milk by *Lactobacillus casei* PRA205 and *Lactobacillus rhamnosus* PRA331, *International Dairy Journal*, 85, 237-246.

Somers, J. M., Guinee, T. P. ve Kelly, A. L., 2002, The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 55 (1), 5-11.

Somkuti, G. A. ve Paul, M., 2010, Enzymatic fragmentation of the antimicrobial peptides casocidin and isracidin by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus*

delbrueckii ssp. *bulgaricus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (1), 235-242.

Sommerer, N., Salles, C., Promé, D., Promé, J. ve Le Quéré, J., 2001, Isolation of oligopeptides from the water-soluble extract of goat cheese and their identification by mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (1), 402-408.

Sousa, M., Ardö, Y. ve McSweeney, P., 2001, Advances in the study of proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 11 (4-7), 327-345.

Spanneberg, R., Salzwedel, G. ve Glomb, M. A., 2012, Formation of early and advanced Maillard reaction products correlates to the ripening of cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2), 600-607.

St-Gelais, D. ve Haché, S., 2005, Effect of β-casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening, *Food Research International*, 38 (5), 523-531.

Stanton, G. J., Hughes Jr, T. K. ve Boldogh, I., 2005, Use of colostrinin, constituent peptides thereof, and analogs thereof, as oxidative stress regulators, Google Patents.

Steele, J. L., 1995, Contribution of lactic acid bacteria to cheese ripening, In: Chemistry of structure-function relationships in cheese, Eds: Springer, p. 209-220.

Suetsuna, K. ve Nakano, T., 2000, Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*), *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (9), 450-454.

Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M., Andrighetto, C. ve Lanorte, M., 2000, A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino), *Journal of Applied Microbiology*, 89 (2), 267-274.

Swaisgood, H., 1992, Chemistry of the caseins, In: Advanced dairy chemistry-1: Proteins, Eds: F, F. P.: Elsevier, p. 63-110.

Swaisgood, H. E., 2003, Chemistry of the caseins, In: Advanced dairy chemistry—1 Proteins: Part A / Part B, Eds: Fox, P. F. ve McSweeney, P. L. H., *Boston, MA*: Springer US, p. 139-201.

Tadjine, D., Boudalia, S., Bousbia, A., Khelifa, R., Mebirouk Boudechiche, L., Tadjine, A. ve Chemmam, M., 2019, Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk, *Food Science and Technology* (Ahead of print), 1-8.

Taivosalo, A., Kriščiunaite, T., Seiman, A., Part, N., Stulova, I. ve Vilu, R., 2018, Comprehensive analysis of proteolysis during 8 months of ripening of high-cooked Old Saare cheese, *Journal of Dairy Science*, 101 (2), 944-967.

Tan, P. T., Poolman, B. ve Konings, W. N., 1993, Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*, *Journal of Dairy Research*, 60 (2), 269-286.

Tekin, A. ve Güler, Z., 2019, Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: Effect of ripening materials, *Food Chemistry*, 286, 160-169.

Theriot, C. M., Tove, S. R. ve Grunden, A. M., 2009, Biotechnological applications of recombinant microbial prolidases, *Advances in Applied Microbiology*, 68, 99-132.

Thomas, S., Besset, C., Courtin, P. ve Rul, F., 2010, The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition, *Journal of Applied Microbiology*, 108 (1), 148-157.

Thorn, D. C., Ecroyd, H. ve Carver, J. A., 2014, Polymorphism in casein protein aggregation and amyloid fibril formation, In: Bio-nanoimaging, Eds: Elsevier, p. 323-331.

Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J. ve Petrón, M. J., 2019, Antioxidant peptides (< 3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin, *Food Research International*, 120, 643-649.

Tobiassen, R., Pripp, A., Stepaniak, L. ve Sørhaug, T., 1996, Purification and characterization of an endopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii*, *Journal of Dairy Science*, 79 (12), 2129-2136.

Tonolo, F., Fiorese, F., Moretto, L., Folda, A., Scalcon, V., Grinzato, A., Ferro, S., Arrigoni, G., Bindoli, A. ve Feller, E., 2020, Identification of new peptides from fermented milk showing antioxidant properties: Mechanism of action, *Antioxidants*, 9 (117), 1-24.

Torres-Llanez, M., González-Córdova, A., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. ve Vallejo-Cordoba, B., 2011, Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese, *Journal of Dairy Science*, 94 (8), 3794-3800.

TS, T. S. E., 1995, 3001, Tulum peyniri standardı. Ankara.

Tuncel, N. B., Güneşer, O., Engin, B., Yaşar, K., Zorba, N. N. ve Karagül-Yüceer, Y., 2010, Ezine peyniri II. olgunlaşma süresince proteoliz düzeyi, *Gıda*, 35 (1), 1-6.

Uchida, N., Goto, H., Ohsawa, K. ve Ohki, K., 2012, Process for preparing casein-derived peptides by fermentation of lactic acid bacteria, Google Patents.

Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A. ve Nakajima, H., 2012, Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats, *International Dairy Journal*, 22 (1), 24-30.

Ueno, K., Mizuno, S. ve Yamamoto, N., 2004, Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of

antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4, *Letters in Applied Microbiology*, 39 (4), 313-318.

Üçüncü, M., 2008, A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi *İzmir*, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, p. 905-914.

Üçüncü, M., 2013, Süt ve mamulleri teknolojisi, *İzmir*, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, p. 590.

Valdés-Stauber, N., Scherer, S. ve Seiler, H., 1997, Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 34 (2), 115-129.

Van den Tempel, T. ve Jakobsen, M., 2000, The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu, *International Dairy Journal*, 10 (4), 263-270.

van Elswijk, D. A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U. R. ve van der Greef, J., 2003, Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography–biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1020 (1), 45-58.

Vavrusova, M., Pindstrup, H., Johansen, L. B., Andersen, M. L., Andersen, H. J. ve Skibsted, L. H., 2015, Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant, *International Dairy Journal*, 47, 86-93.

Veljovic, K., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., Abriouel, H., Galvez, A. ve Topisirovic, L., 2009, Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products, *European Food Research and Technology*, 230 (1), 63-70.

Venema, D., Herstel, H. ve Elenbaas, H., 1987, Determination of the ripening time of Edam and Gouda cheese by chemical analysis, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41 (3), 215-226.

Vicente, M. S., Ibáñez, F. C., Barcina, Y. ve Barron, L. J. R., 2001, Casein breakdown during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (2), 210-215.

Villegas, J. M., Picariello, G., Mamone, G., Turbay, M. B. E., de Giori, G. S. ve Hebert, E. M., 2014, Milk-derived angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, *Peptidomics*, 1 (1), 22-29.

Wallace, J. ve Fox, P., 1998, Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review, *Food Chemistry*, 62 (2), 217-224.

Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H. ve Andrén, A., 2006, Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3296-3305.

Wijesinha-Bettoni, R. ve Burlingame, B., 2013, Milk and dairy product composition, In: Milk and dairy products in human nutrition, Eds: Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D., *Italy*: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), p. 41-102.

Williams, A. G. ve Banks, J. M., 1997, Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom, *International Dairy Journal*, 7 (12), 763-774.

Yamamoto, N., Akino, A. ve Takano, T., 1994, Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, *Journal of Dairy Science*, 77 (4), 917-922.

Zucht, H.-D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.-J. ve Forssmann, W.-G., 1995, Casocidin-I: a casein-α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity, *FEBS Letters*, 372 (2-3), 185-188.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hale İnci ÖZTÜRK
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya / 04.09.1989
Telefon	**:**	0534 460 1766
Faks	**:**	
e-mail	**:**	inci.ozturk@gidatarim.edu.tr, haleinciozturk@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Selçuklu Anadolu Lisesi, Selçuklu, Konya	2007
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2012
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2015
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2018	Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI

Gıda Biyoteknolojisi, Gıda Mikrobiyolojisi, Süt ve Süt Ürünleri Teknolojisi, Süt Ürünleri Mikrobiyolojisi

YABANCI DİLLER

İngilizce

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

Keçi Sütlerinde miRNA'ların Belirlenmesi ve bu Sütleri Tüketen İnsanlara miRNA'ların Transportunun Değerlendirilmesi, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı: ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, Yürütücü: AKIN NİHAT, Araştırmacı: KAYIŞ SEYİT ALİ, Araştırmacı: Pandey Anamika, Araştırmacı: KHAN MOHD KAMRAN, 28/07/2016 - 28/04/2018 (ULUSAL)

YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. DEMİRCİ TALHA, SERT DURMUŞ, AKTAŞ KÜBRA, SÖZERİ ATİK DİDEM, ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2019). Influence of hot and cold break tomato powders on survival of probiotic *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, texture profile and antioxidative activity in set-type yoghurts. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, Doi: 10.1016/j.lwt.2019.108855 (Yayın No: 5518135).

2. DEMİRCİ TALHA, ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, ORAÇ AYSUN, KONAK GÖKTEPE ÇİĞDEM, SÖZERİ ATİK DİDEM, AKTAŞ KÜBRA, AYDIN SÜMEYYE, SERT DURMUŞ, AKIN NİHAT (2019). Immature Wheat Grain as a Potential Prebiotic Ingredient in Set-type Yoghurts: Impact on Antioxidative, Textural Properties and Survival of Different Probiotics. JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE, 56(12), 5474-5483., Doi: 10.1007/s13197-019-04019-7 (Yayın No: 5057151).

3. KAZANCIGİL ERHAN, DEMİRCİ TALHA, ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2019). Isolation, technological characterization and in vitro probiotic evaluation of *Lactococcus* strains from traditional Turkish skin bag Tulum cheeses. ANNALS OF MICROBIOLOGY, 69(12), 1275-1287., Doi: 10.1007/s13213-019-01512-4 (Yayın No: 5203222).

4. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AYDIN SÜMEYYE, SÖZERİ ATİK DİDEM, DEMİRCİ TALHA, SERT DURMUŞ, AKIN NİHAT (2018). Fortification of set-type yoghurts with *Elaeagnus angustifolia* L. flours: Effects on physicochemical, textural, and microstructural characteristics. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 90(null), 620-626., Doi: 10.1016/j.lwt.2018.01.012 (Yayın No: 4328804).

5. ÖZTÜRK HALE İNCİ, DEMİRCİ TALHA, AKIN NİHAT (2018). Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 90(null), 339-345., Doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.049 (Yayın No: 4328801).

6. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2017). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. FOOD SCIENCE AND TECNOLOGY, Doi: 10.1590/1678-457x.11917 (Yayın No: 4328807) (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

7. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AYDIN SÜMEYYE, AKIN NİHAT (2017). Effect of Lavender Powder on Microbial, Physicochemical, Sensory and Functional Properties of Yoghurt. INTERNATIONAL JOURNAL OF SECONDARY METABOLITE, 4, 94-102., Doi: 10.21448/ijsm.363350 (Yayın No: 4328811).

8. DEMİRCİ TALHA, AKTAŞ KÜBRA, SÖZERİ ATİK DİDEM, ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2017). Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS, 36(null), 396-403., Doi: 10.1016/j.jff.2017.07.019 (Yayın No: 4328802).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. GEDİKOĞLU AYÇA, AYTAÇ EZGİ, ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, SÖKMEN MÜNEVVER (2019). Effects of Extraction Methodology on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Cistus creticus*. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5051028).

2. GEDİKOĞLU AYÇA, ÖZTÜRK NEGİŞ HALE İNCİ, Çelik Büşra Zeynep, Büyük Emine, AYTAÇ EZGİ, BUZRUL SENCER, SÖKMEN MÜNEVVER (2019). Cistus Ekstraktının Kokteyl Sosislerde Sodyum Askorbat ve Askorbik Asit Yerine Kullanımının Değerlendirilmesi. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5052642).

3. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AYDIN SÜMEYYE, AKIN NİHAT (2017). Effect of lavender powder on microbial, physicochemical, sensory and functional properties of yoghurt. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants Natural and Healthy Life. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840236).

4. DEMİRCİ TALHA, ÖZTÜRK HALE İNCİ, SÖZERİ ATİK DİDEM, ORAÇ AYSUN, KONAK ÇİĞDEM, AKIN NİHAT (2016). Viability of *L. acidophilus* Ncfm Howaru in yoghurt enriched with immature wheat grain powder during refrigeration. 2nd International Conference on Science, Ecology and Technology (ICONSETE). (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840343).

5. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2016). Production of new functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: the comparison of the physicochemical, sensory and functional characteristics and prebiotic effects. 1st International Multidisciplinary Conference on Nutraceuticals and Functional Foods. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840239).

6. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2015). Examination of functional properties and bioactive peptide contents of Tulum cheese. 3rd International Symposium on Innovative Technologies in Engineering and Science (ISITES 2015) (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840349).

7. AKIN NİHAT, DEMİRCİ TALHA, ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKTAŞ KÜBRA, DERTLİ ENES (2014). Probiotic beverage from black carrot juice fermented with *Lactobacillus casei*. 3rd International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional Baby Foods. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840233).

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler

1. Microbial Cultures and Enzymes in Dairy Technology, Bölüm adı:(The Effects of Probiotic Cultures on Quality Characteristics of Ice Cream) (2018)., AKIN NİHAT, ÖZTÜRK HALE İNCİ, IGI Global, Editör: Şebnem Öztürkoğlu Budak, H. Ceren Akal, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 413, ISBN: https://www.igi-global.com/chapter/the-effects-of-probiotic-cultures-on-quality-characteristics-of-ice-cream/202814, İngilizce (Bilimsel Kitap), (Yayın No: 4328822).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. ÖZTÜRK HALE İNCİ, AKIN NİHAT (2017). Yoğurt bileşenlerinin sağlık üzerine etkisi. 1. Ulusal Sütçülük Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4840344).

2. ÖZTÜRK HALE İNCİ, TÜRKER SELMAN, ERTAŞ NİLGÜN, MADENCİ AYŞE BÜŞRA (2012). Geleneksel Türk tatlıları: Azık ve semene. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4840346).