

**SÜTTE PLAZMİN VE KİMOZİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE
BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ETKİSİ VE SÜREÇLERE
UYARLANABİLİRLİĞİ**

**THE EFFECTS OF SOME PHENOLICS ON THE
ACTIVITY OF PLASMIN AND CHYMOSIN IN MILK
AND ITS APPLICATION TO THE PROCESSES**

SEDA ELİKOĞLU

PROF. DR HALİL VURAL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

SEDA ELİKOĞLU'nun hazırladığı "Sütte plazmin ve kimoziin aktivitesi üzerine bazı fenolik bileşiklerin etkisi ve süreçlere uyarlanabilirliği" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nuray KOLSARICI

Başkan

Prof. Dr. Halil VURAL

Danışman

Prof. Dr. Vural GÖKMEN

Üye

Prof. Dr. Hami ALPAS

Üye

Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Goft ki divane ne i Laik-i in hane ne i”

Mevlana

Yaşar Kemal Erdem’in anısına

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

___ / ___ / 2021

SEDA ELİKOĞLU

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

..... / /

(İmza)

SEDA ELİKOĞLU

ÖZET

SÜTTE PLAZMİN VE KİMOZİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ETKİSİ VE SÜREÇLERE UYARLANABİLİRLİĞİ

Seda ELİKOĞLU

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil VURAL

Ocak 2021, 95 sayfa

Fenolik bileşikler, epidemiyolojik araştırmalarla kanıtlanan sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı gıda bilimi ve teknolojisi alanında da son yıllarda gittikçe artan bir ivme ile araştırılmaya devam etmektedir. Yoğurt, dondurma ve peynir gibi birçok süt ürünüde gerek kaliteyi geliştirmek, gerekse de ürünlere fonksiyonellik katmak amacı ile polifenollerin kullanılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Fenolik bileşiklerin çeşitli enzimlerin inhibisyonuna yol açtığı da birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Ancak, süt endüstrisi için önem taşıyan proteolitik enzimler ile polifenollerin etkileşimleri ve bu etkileşimlerin doğurduğu sonuçlar üzerine çok az çalışma bulunmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında plazmin ve kimoziin enzimleri ile fenolik bileşiklerin etkileşimleri moleküler düzeyde incelenerek olası enzim inhibisyonları değerlendirilmiş ve enzim aktivitesinde meydana gelen değişimlerin peynir yapımı ve olgunlaştırma süreçlerine etkisi tartışılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular ile, kimoziin enzimi ile

fenolik bileşiklerin enzim inhibisyonuna yol açacak güçte interaksiyona giremediği ve /veya olası etkileşimlerin kimozinin korunaklı aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe yol açmaması nedeniyle inhibisyon görülmediği sonucuna ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra, çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerden epikateşin gallat (ECG), epigallokateşin gallat(EGCG), kuersetin (QUER), myrisetin (MYR), ve kurkuminin (CURC) plazmin enzimini %60, 86, 65, 90, 52 oranında inhibe ettiği, süt proteinleri varlığında ise inhibisyon oranlarının sıra ile %35, 47, 44, 46 ve 40'a düştüğü gözlenmiştir. Yürütülen kalorimetrik ve spektroskopik çalışmalar ile, plazmine karşı inhibitör özellik gösteren flavonoidlerin, H-bağları ve elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu interaksiyonlar ile plazmine bağlanarak, plazminin doğal haldeki baskın düzensiz yapısını daha düzenli ikincil yapılara doğru değiştirdiği belirlenmiştir. İnhibisyon kinetikleri incelendiğinde EGCG, QUER ve MYR'in yarışmasız; ECG ve CURC'in ise karışık tip inhibisyona yol açtığı bulunmuştur.

Model sistemlerdeki denemelerin ardından, peynir yapımı ve olgunlaştırma sürecinde yürütülecek denemeler için yeşil çay ekstraktının (YÇE) kullanılmasına karar verilmiştir. Peynir yapımı sürecinde kimozin ile pıhtılaşma kinetiklerinin eklenecek yeşil çay fenoliklerinden etkilendiği ve pıhtılaşmanın ilk aşaması olan enzimatik faz sürecinde kazeinomakropeptit (CMP) oluşum hızının yeşil çay fenolikleri varlığında düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca koagülasyonun ikinci aşamasında (flokülasyon fazı), misel agregasyonunun yeşil çay ekstraktı ilavesi ile yavaşladığı dinamik ışık saçılımı spektrofotometresi (DLS) ile belirlenmiştir.

Peynir yapımı aşamasında süte ilave edilen plazmin, olgunlaşma sürecinde YÇE ilavesinden etkilenmemiş; buna karşın kimozin aktivitesi YÇE'li peynirlerde kontrol peynir örneklerine oranla daha düşük seviyede seyretmiştir. Peynir örneklerinde olgunlaşmanın belirteci olarak nitelendirilebilecek pH 4.6'da çözünür azotlu madde analizlerinden elde edilen sonuçlar, YÇE'li peynir örneklerindeki birincil proteolizin kontrol örneklere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğunu göstermektedir. Bu verilerin yanı sıra, olgunlaşma sürecinde sütün asal proteinlerinden α_{s1} -kazeinin hidrolize uğrama hızının YÇE'li örneklerde daha yavaş olduğu, β -kazein hidrolizinde ise kontrol ve YÇE'li örnekler arasında önemli bir fark olmadığı üre-PAGE analizleri ile belirlenmiştir. Olgunlaşma sürecinde kazeinlerin proteolizi ile açığa çıkan peptitlerin RP-HPLC ile izlenen profilleri değerlendirildiğinde, YÇE ilavesinin ekstra peptit oluşumuna

yol açmadığı ancak bazı peptitlerin oluşum hızını yavaşlattığı sonucuna ulaşılmıştır. Böylelikle, peynirlerde plazmin ve kimozen aktivitesi sonucu elde edilen verilerin de proteoliz süreci ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında fenolik bileşiklerin kimozen ve plazmin aktivitesi üzerine etkileri model sistemlerde moleküler düzeyde tanımlanmış, ancak peynir üretimi ve olgunlaşma aşamalarında elde edilen analiz sonuçları model sistemler ile uyumluluk göstermemiştir. Peynir matrisinin olgunlaşma süreci boyunca sürekli değişen parametrelere sahip, dinamik bir yapı olduğu düşünüldüğünde, bu durumun enzim-fenolik etkileşimlerini de önemli oranda etkileyebileceği düşünülmektedir. Yine de, elde edilen veriler ışığında, fenolikçe zenginleştirilmiş süt ürünleri üretiminde, sürece katılan proteolitik enzimler ile fenoliklerin etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin sonuçlarının son derece kritik olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: enzimatik koagülasyon, süt, olgunlaşma süreci, rennet, kimozen, plazmin, enzim inhibisyonu, fenolik

ABSTRACT

THE EFFECTS OF SOME PHENOLICS ON THE ACTIVITY OF PLASMIN AND CHYMO SIN IN MILK AND ITS APPLICATION TO THE PROCESSES

Seda ELİKOĞLU

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Halil VURAL

January 2021, 95 pages

Phenolic compounds have been of great interest to food scientists and technologists due to epidemiologically approved health benefits. There are a number of studies investigating possible use of polyphenols in dairy such as yoğurt, ice cream and cheese for developing final product quality and functionality. Besides, inhibitory properties of several phenolics against diverse enzymes have also been reported. However, the interactions between proteolytic enzymes important for dairy industry and polyphenols have been studied to a lesser extent.

In this thesis, the potential inhibition of plasmin and chymosin via phenolic compounds have been investigated with molecular and kinetic studies and the consequences of changes in enzyme activities during cheesemaking and ripening were evaluated. The findings of this study revealed that, interactions between chymosin and phenolics are not strong enough or/and the possible interactions does not lead a conformational change on active site of chymosin leading to unchanged chymosin activity upon binding of polyphenols. However, ECG, EGCG, QUER, MYR and CURC showed 60, 86, 65, 90, 52 % inhibition against plasmin, respectively. The inhibition ratios, however, diminished to 35, 47, 44, 46 ve 40 % in the presence of milk proteins. Spectroscopic and calorimetric studies showed that, the interactions between inhibitory phenolics and plasmin were

dominated by H-bonds and electrostatic attractions which leads to a change in secondary structure elements of plasmin, having more ordered structure upon binding to polyphenols. Inhibition modes of plasmin by EGCG, QUER ve MYR were non-competitive, whereas ECG and CURC showed a mixed-type inhibition against plasmin.

Green tea extract (GTE), as a natural source of phenolics, was preferred for model cheesemaking and ripening studies. During cheesemaking, kinetics of rennet coagulation were affected by GTE addition. CMP (caseinomacropeptide) formation rate was found to be decreased by GTE phenolics during enzymatic phase of renneting. In addition, aggregation of para-casein micelles measured by dynamic light scattering spectroscopy (DLS) also retarded in the presence of GTE.

Plasmin activity did not change in the presence of GTE whereas, residual chymosin activity decreased in GTE-added cheeses, compared to control cheese samples. The results of pH 4.6 soluble nitrogen amount analysis, as an indicator of ripening in cheese, showed that the primary proteolysis in GTE cheeses was hindered to some extent. Besides, urea-PAGE analysis revealed that, α_{s1} -casein hydrolysis rate was higher for control cheese samples. However, the difference of β -casein hydrolysis among control and GTE added cheeses was statistically insignificant. RP-HPLC analysis was carried out in order to evaluate the peptide profile of cheese samples during ripening period. The results revealed that, green tea phenolics did not cause any change in proteolysis pathway, whereas the formation rate of some peptides were found to be less in the presense of GTE phenolics. These results were in agreement with enzyme activity results during ripening.

The effects of phenolics on plasmin and chymosin activity in model systems were described in molecular level. However, the findings observed during cheesemaking and ripening period were not in agreement with model system studies. Knowing the fact that the structure of cheese matrice during ripening has a dynamic structure due to the changes in many parameters, the phenolic-enzyme interactions were probably affected during this processes. Nevertheless, in the light of the findings of this study, the interactions between phenolics and the proteolytic enzymes and the consequences of these interactions were thought to be critical.

Keywords: enzymatic coagulation, milk, ripening period, rennet, chymosin, plasmin, enzyme inhibition, phenolics

TEŞEKKÜR

Öncelikle, fiziken aramızda olmasa da, düşünceleri ile ilham vermeye devam eden Prof. Dr. Yaşar Kemal Erdem'e, birlikte çalıştığımız süre boyunca verdiği akademik özgürlükten, özverisinden, sabrından ve sonsuz desteğinden dolayı tüm kalbimle ve minnetle teşekkür ederim. Onunla bu yola başlamak en büyük ayrıcalıktı!

Kapısını her zaman çalabildiğim, danışman hocam sayın Prof. Dr. Halil Vural'a tezimi tamamlama sürecindeki yardımları ve yönlendirmeleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tezin yürütülmesinde her türlü çalışma olanağı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca 2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı ile sağladığı maddi destekten ötürü TÜBİTAK BİDEB'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım boyunca, çıkmaza düştüğüm anlarda çekinmeden başvurduğum, tüm sorularıma bıkmadan cevap veren Doç. Dr. Ceyda Dudak Şeker'e hem yardımları hem de güven veren dostluğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü hayatımın başında tanıştığım, sevincimi, hüznümü, kederimi paylaştığım; desteklerini ve sevgilerini her zaman yakından hissettiğim Meltem Yıldırım, Yelda Zencir, Nurdan Ersöz ve Ecem Evrim Çelik'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bitmek tükenmek bilmeyen fedakarlıkları, özverileri ve emekleri için anneme ve babama teşekkür ederim. Siz olmasaydınız, başaramazdım!

Son olarak, hayattaki en büyük şansım olarak gördüğüm; her zaman desteğini ve varlığını en derinden hissettiğim, eşim Canel Elikoğlu'na; ve bana yaşattığı paha biçilemez duygular için, canım oğlum Demir'e sonsuz teşekkürler. Varlığınız hayattaki en güzel hediye!

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler ve Süt Endüstrisi.....	4
2.2. Fenolik Bileşikler.....	5
2.3. Fenolik Bileşikler ve Protein Etkileşimleri.....	8
2.4. Fenolik Bileşikler ve Enzim Etkileşimleri.....	12
2.5. Plazmin Enzim Sistemi ve Süt Ürünleri.....	15
2.5.1. Plazmin.....	16
2.5.2. Plazmin Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	17
2.5.3. Süt Ürünlerinde Plazmin Aktivitesi.....	18
2.6. Kimozin ve Süt Ürünleri.....	20
2.6.1. Kimozin.....	20
2.6.2. Kimozinin Etki Mekanizması ve Aktivitesi.....	21
2.7. Peynir Üretimi ve Proteoliz.....	22
2.7.1. Sütün Enzimatik Pıhtılaşma Süreci.....	22
2.7.2. Peynirin Olgunlaşma Süreci.....	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Metot.....	26
3.2.1. Plazmin Aktivitesi Ölçümleri.....	26
3.2.2. Plazmin İnhibisyon Denemeleri.....	27
3.2.2.1. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi ve IC50 Değerlerinin Belirlenmesi.....	27

3.2.2.2. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile Plazmin Konformasyonunun Belirlenmesi	27
3.2.2.3. Plazmin-fenolik Etkileşimlerine Ait Termodinamik Parametrelerin İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (İTK) ile Belirlenmesi	28
3.2.3. Yeşil Çay Ekstraktının Sütün Plazmin ile Pıhtılaşmasına Etkisinin Belirlenmesi	29
3.2.4. Kimozin Aktivitesi Ölçümleri	29
3.2.5. Kimozin İnhibisyon Denemeleri	30
3.2.5.1. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile Kimozin Konformasyonunun Belirlenmesi	30
3.2.5.2. Kimozin-fenolik Etkileşimlerine Ait Termodinamik Parametrelerin İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (İTK) ile Belirlenmesi	30
3.2.6. CMP (Kazeinomakropeptit) Analizi	31
3.2.7. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli (ζ) Ölçümü	31
3.2.8. Minyatür Peynir Üretimi	32
3.2.8.1. Peynire İşlenecek Süte Uygulanan Kimyasal Analizler	32
3.2.8.2. Minyatür Peynir Üretim Basamakları	32
3.2.9. Olgunlaşma Sürecinde Peynir Analizleri	33
3.2.9.1. Plazmin Aktivitesi Ölçümleri	33
3.2.9.2. Kalıntı Kimozin Aktivitesi Ölçümleri	33
3.2.9.3. Kuru madde Tayini	33
3.2.9.4. Protein Tayini	34
3.2.9.5. pH 4.6'da Çözünür Azotlu Madde Miktarının Belirlenmesi	34
3.2.9.6. üre-PAGE Analizi	34
3.2.9.7. RP-HPLC ile Peptit Profilinin Belirlenmesi	35
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Fenolik Bileşiklerin Plazmin Aktivitesi Üzerine Etkisi	36
4.2. Plazmin İnhibisyonunun Kinetik Değerlendirmesi	38
4.3. Fenolik Bileşikler ile Etkileşimin Plazmin Enziminin Sekonder Yapısı Üzerine Etkisi	44
4.4. İnhibitör Fenolikler ile Plazmin Etkileşimlerinin Termodinamik Özellikleri	46
4.5. YÇE'nin Sütün Plazmin ile Pıhtılaşmasına Etkisi	52
4.6. Fenolik Bileşiklerin Kimozin Aktivitesi Üzerine Etkisi	53

4.7. Fenolik Bileşikler ile Etkileşimin Kimozinin Sekonder Yapısı Üzerine Etkisi...	54
4.8. Kimozin-Fenolik Etkileşimlerinin Termodinamik Özellikleri.....	58
4.9. YÇE İlavesinin Sütün Enzimatik Koagülasyon Sürecine Etkisi.....	58
4.10. Peynir Sütü Kimyasal Kompozisyonu.....	63
4.11. Olgunlaşma Sürecinde Minyatür Peynir Örneklerine Ait Analiz Sonuçları.....	63
4.11.1. Rutubet Değerleri.....	63
4.11.2. Toplam Protein İçeriği	64
4.11.3. pH değerleri	64
4.11.4. Plazmin Aktivitesi.....	65
4.11.5. Kalıntı Kimozin Aktivitesi	67
4.11.6. Olgunlaşma Sürecinde YÇE İlavesinin Proteoliz Düzeyine Etkisinin Değerlendirilmesi	68
5. SONUÇ.....	74
6. KAYNAKLAR	78
EKLER	90
EK 1- RP-HPLC KRAMOTOGRAMLARI.....	90
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Sütte plazmin enzim sistemi	15
Şekil 2. 2. Kimozin: a) Protein yapısı b) varyantları ve c) 3-boyutlu yapısı	20
Şekil 2. 3. Sütün enzimatik koagülasyonunun şematik gösterimi	23
Şekil 4. 1. Model sistemlerde plazminin 300µM fenolik ile etkileştirildikten sonraki (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CURC, FA, CA, GA) ve kontrol örneklerle (C0, ECG0, EGCG0, QUER0, MYR0, RESV0, CURC0, FA0, GA0, CA0) ait reaksiyon hızları.....	36
Şekil 4. 2. Süt matrisinde, plazminin 300µM fenolik ile etkileştirildikten sonraki (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CURC, FA, CA, GA) ve kontrol örneklerle (C0, ECG0, EGCG0, QUER0, MYR0, RESV0, CURC0, FA0, GA0, CA0) ait reaksiyon hızları.....	37
Şekil 4. 3. 300µM epikateşin gallat (ECG) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği	38
Şekil 4. 4. 300µM epigallokateşin gallat (EGCG) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği.....	39
Şekil 4. 5. 300µM kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği	39
Şekil 4. 6. 300µM kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği	40
Şekil 4. 7. 300µM kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği	40
Şekil 4. 8. Epikateşin gallata ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC ₅₀ değerleri.	41
Şekil 4. 9. Epigallokateşin gallata ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	42
Şekil 4. 10. Kuersetine ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC ₅₀ değerleri. ..	42
Şekil 4. 11. Myrisetine ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC ₅₀ değerleri. ..	43
Şekil 4. 12. Kurkumine ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC ₅₀ değerleri. 43	

- Şekil 4. 13. Native plazmin (PLAZMİN(KONTROL)) ve plazmine karşı inhibitör özellik gösteren fenolik bileşik-plazmin komplekslerine (EGCG, ECG, CURC, QUER, MYR) ait far-UV CD spektrumları44
- Şekil 4. 14. Native plazmin (PLAZMİN (KONTROL)) ve plazmine karşı inhibitör özellik göstermeyen fenolik bileşik-plazmin komplekslerine (RESV, C, CA, FA, GA) ait far-UV CD spektrumları45
- Şekil 4. 15. Plazminin (2µM), 50µM epikateşin gallat (ECG) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.47
- Şekil 4. 16. Plazminin (2µM), 50µM epigallokateşin gallat (EGCG) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.48
- Şekil 4. 17. Plazminin (2µM), 50µM kuersetin (QUER) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.49
- Şekil 4. 18. Plazminin (2µM), 50µM myrisetin (MYR) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli

çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.....	50
Şekil 4. 19. Plazminin (2µM), 50µM kurkumin (CUR) ile titrasyonuna ait İTK termogramı (A), seyrelme ısısını temsil eden kontrol denemesi (B) ve plazminin CURC ile titrasyonu sonucu açığa çıkan reaksiyon ısılarından kontrol reaksiyon ısılarının (seyrelme ısısı) çıkarılması ile elde edilen bağlanma ısısını temsil eden termogram (C).....	51
Şekil 4. 20. Plazminin kazeinler üzerine proteolitik aktivitesini gösteren pıhtı miktarları (mL) (negatif kontrol: süt+YÇE; pozitif kontrol: süt+plazmin; plazmin+YÇE: süt+plazmin+YÇE).....	52
Şekil 4. 21. Kimozin (KONTROL) ve her biri 500 µM derişime sahip farklı fenolik bileşikler ile inkübe edilmiş kimozin-fenolik komplekslerine (C:kateşin, ECG:epikateşin gallat, EGCG:epigallokateşin gallat, FA:ferulik asit, GA:gallik asit, CA:kumarik asit, QUER:kuersetin, MYR:myrisetin, CURC:kurkumin, RESV:resveratrol) ait reaksiyon hızı değerleri	53
Şekil 4. 22. Kimozin (control) ve her biri 500 µM derişime sahip farklı fenolik bileşikler ile süt matrisinde inkübe edilmiş kimozin-fenolik komplekslerine (C:kateşin, ECG:epikateşin gallat, EGCG:epigallokateşin gallat, FA:ferulik asit, GA:gallik asit, CA:kumarik asit, QUER:kuersetin, MYR:myrisetin, CURC:kurkumin, RESV:resveratrol) ait aktivite değerleri	54
Şekil 4. 23. 50 µM fenolik bileşik ile inkübe edilen (50FA, 50CA, 50GA, 50 CAT, 50 ECG, 50 EGCG, 50 RES, 50 QUER, 50 MYR, 50CURC) kimozin-fenolik komplekslerine (10 µM) ve kontrol kimozin örneklerine (0FA, 0CA, 0GA, 0 CAT, 0 ECG, 0 EGCG, 0 RES, 0 QUER, 0 MYR, 0CURC) ait far-UV CD spektrumları.....	56
Şekil 4. 24. YÇE ilavesi olmayan kontrol örneği (KONTROL), 1000ppm YÇE ilave edilen süt örneği (YÇE-1000) ve 2000ppm YÇE ilave edilen süt örneğinde (YÇE-2000) rennetleme süresi boyunca relatif CMP (kazeinomakropeptid-(A + B)) miktarlarındaki değişim.	59
Şekil 4. 25. Kontrol süt örneklerinde kazein misellerinin ortalama boyut dağılımı (Enzim ilavesi öncesi (○) ve enzim ilavesinden 10 dk (Δ), 20 dk(■), 30 dk (●), 45 dk (×), 60 dk (◆) sonrasında alınan örnekler).....	60

Şekil 4. 26. YÇE ilaveli süt örneklerinde kazein misellerinin ortalama boyut dağılımı (Enzim ilavesi öncesi (○) ve enzim ilavesinden 10 dk (Δ), 20 dk(■), 30 dk (●), 45 dk (×), 60 dk (◆) sonrasında alınan örnekler).....	61
Şekil 4. 27. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde (YÇE-peynir) olgunlaşma süresince ölçülen kalıntı kimoziin aktivitesi değerleri (nmol ürün/saat · g kurutulmuş peynir).....	67
Şekil 4. 28. Olgunlaşma süreci boyunca (1., 15., 30., ve 60. günler) kontrol ve YÇE-peynire ait üre-PAGE elektroforetogramı (1 ve 10: Standart Na-kazeinat; 2,4,6,8: Kontrol peynir; 3,5,7,9: YÇE peynir).....	69
Şekil 4. 29. Kontrol (K) ve YÇE ilavesi ile üretilen minyatür peynirlerde (YÇE) olgunlaşmanın 15. gününde pH 4.6 çözünür fraksiyona ait RP-HPLC kromatogramları.....	71
Şekil 4. 30. Kontrol (K) ve YÇE ilavesi ile üretilen minyatür peynirlerde (YÇE) olgunlaşmanın 30. gününde pH 4.6 çözünür fraksiyona ait RP-HPLC kromatogramları.....	71
Şekil 4. 31. Kontrol (K) ve YÇE ilavesi ile üretilen minyatür peynirlerde (YÇE) olgunlaşmanın 60. gününde pH 4.6 çözünür fraksiyona ait RP-HPLC kromatogramları.....	72
Şekil Ek 1. Saflaştırılmış fenolikler ile elde edilen kateşin karışımına ait RP-HPLC kromatogramı (C: kateşin, EC: epikateşin, ECG: epikateşin gallat, EGCG: epigallokateşin gallat, CG: kateşin gallat, GCG: gallokateşin gallat).....	90
Şekil Ek 2. Saflaştırılmış fenolikler ile elde edilen kateşin karışımına (K) ve denemelerde kullanılan yeşil çay ekstraktına (YÇE) ait RP-HPLC kromatogramları	90
Şekil Ek 3. Kalıntı kimoziin analizinde kullanılan substrata ait RP-HPLC kromatogramı (S: substrat).....	91
Şekil Ek 4. Kalıntı kimoziin analizinde kullanılan substratın kimoziin ile etkileştirildikten sonraki karışımına ait RP-HPLC kromatogramı (S: substrat, P: ürün).....	91
Şekil Ek 5. Kontrol peynir örneklerinde 120 dakikalık rennetlenme sürecinde belli zaman aralıklarında alınan örneklere ait kromatogramlar.....	92
Şekil Ek 6. YÇE ilaveli peynir örneklerinde 120 dakikalık rennetlenme sürecinde belli zaman aralıklarında alınan örneklere ait kromatogramlar.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ve aglikan formlarına örnekler.....	6
Çizelge 3. 1. RP-HPLC ile kalıntı kimozin analizinde kullanılan gradient program	34
Çizelge 3. 2. Peptit profilinin belirlenmesinde kullanılan RP-HPLC gradient programı.....	35
Çizelge 4. 1. Michaelis Menten denkleğinden elde edilen plazmine ait inhibisyon kinetiğı parametreleri.....	41
Çizelge 4. 2. CDPPro yazılımı ile CONTILL programı kullanılarak elde edilen, plazmin (kontrol) ve plazmin-fenolik komplekslerine ait ikincil yapı içerikleri.....	46
Çizelge 4. 3. İTK denemeleri ile plazminin ECG, EGCG, QUER ve MYR ile titrasyonu sonucu elde edilen termodinamik parametreler.....	52
Çizelge 4. 4. Kimozin-fenolik komplekslerine (50EGCG, 50RESV, 50QUER, 50MYR, 50CURC, 50C, 50ECG, 50FA, 50CA, 50GA) ve kontrol kimozin örneklerine (0EGCG, 0RESV, 0QUER, 0MYR, 0CURC, 0C, 0ECG, 0FA, 0CA, 0GA) ait ikincil yapı içerikleri.....	57
Çizelge 4. 5. Kontrol ve YÇE ilaveli süt örneklerinde enzimatik koagölasyon süreci boyunca ölçülen zeta potansiyeli değerleri.....	62
Çizelge 4. 6. Çalışmada kullanılan süt örneklerinin genel kompozisyonu.....	63
Çizelge 4. 7. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince rutubet miktarları (%)	64
Çizelge 4. 8. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince kuru madde üzerinden toplam protein değerleri (%).....	64

Çizelge 4. 9. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince pH değerleri	65
Çizelge 4. 10. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince ölçülen plazmin aktivitesi değerleri (nmol 7-amino-4-methyl coumarin dk ⁻¹ .g (kuru madde) ⁻¹)	66
Çizelge 4. 11. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince pH 4.6'da çözümlenür azotlu maddelerin toplam azotlu madde miktarına oranı (%)	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
C	Kateşin
CA	Kumarik Asit
CD	Dairesel Dikroizm
CMP	Kazeinomakropeptit
CURC	Kurkumin
ECG	Epikateşin Gallat
EGCG	Epigallokateşin Gallat
FA	Ferulik Asit
GA	Gallik Asit
IDF	International Dairy Federation
İTK	İzotermal Titrasyon Kalorimetresi
K	Bağlanma Katsayısı
MYR	Myrisetin
PRP	Prolince zengin proteinler
RC	Rejenere Selüloz
QUER	Kuersetin
RESV	Resveratrol
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TFA	Trifloroasetik asit
Üre-PAGE	Üre-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
YÇE	Yeşil Çay Ekstraktı
ΔG	Gibbs serbest enerjisi değişimi
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
α -Cn	alfa-kazein
β -Cn	beta-kazein
γ -Cn	gama-kazein
κ -Cn	kappa-kazein

1. GİRİŞ

Sütte doğal olarak bulunan 70'den fazla enzim belirlenmiş olsa da bunlardan birçoğunun somatik hücreler, süt yağı globül membranı ve kan plazması kaynakları ile süte geçiş yaptığı düşünülmektedir. Günümüzde, inek sütünden izole edilen birçok enzimin fizyolojik bir rolünün olmadığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, hidrolitik enzimlerin ve özellikle de proteazların süt ve süt ürünlerinde belirgin değişimlere yol açtığı bilinmektedir.

Plazmin (EC 3.4.21.7), süte doğal olarak bulunan ve plazminojen, plazminojen aktivatörleri, plazmin inhibitörleri ve plazminojen aktivatör inhibitörlerini içeren kompleks bir enzim sistemi içinde yer alan bir proteolitik enzimdir. Plazmin aktivitesi, proteolitik aktivitenin miktarına göre, süt ve süt ürünlerinde arzu edilen ya da edilmeyen birçok sonuca yol açabilmektedir. Örneğin, yüksek düzeydeki plazmin aktivitesi, UHT sütlerde asitlik gelişmeksizin jelleşmeye (age-gelation) yol açmaktadır. Ayrıca, peynirin olgunlaşma sürecinde proteoliz düzeyindeki artış ile kısa zincirli acı peptitlerin oluşumuna yol açarak ürünün duyu kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir [1,2]. Bahsedilen olumsuz özelliklerin yanı sıra, plazmin aktivitesi özellikle spesifik peynir türleri için (Cheddar ve İsveç tipi vb.), olgunlaşma aşamasında gerçekleşen biyokimyasal olaylar açısından elzem olarak görülmektedir [3]. Süt ve ürünlerinde plazminin aşırı aktivite göstermesine bağlı olarak ortaya çıkan olumsuz özelliklerin önüne geçilebilmesi amacı ile yapılan birçok çalışma literatürde yer almaktadır [4-6].

Plazmin enziminin yanı sıra, süt endüstrisinde gerek peynir yapımı gerekse peynirin olgunlaşması aşamalarında anahtar rol oynayan bir diğer proteolitik enzim ise kimozindir (EC 3.4.23.4). Peynir üretim sürecinde dışarıdan eklenen kimozinin pıhtıda kalan miktarı peynirin olgunlaşma aşamasındaki proteoliz sürecine katılmakta ve peynirin tat ve aromasına doğrudan etki etmektedir [3].

Bitkilerin ikincil metabolitleri olan fenolik bileşikler, biyolojik fonksiyonlarından kaynaklanan sağlık üzerine olumlu etkileri nedeni ile yıllardır artan bir ivme ile araştırılmaya devam etmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar fenolik bileşiklerin antienflamatuar, antikanserojen, sinir ve karaciğeri koruyucu özellikleri olduğunu

kanıtlamıştır [7-9]. Bunun yanı sıra, bahsedilen biyoaktif bileşenlerin günlük diyet ile vücuda alınımının, takviye edici olarak kullanımından daha önemli olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [9]. Bu nedenle fenolik bileşikler ile zenginleştirilen gıda ürünleri ile ilgili bilimsel çalışmalar hızla artarak devam etmektedir. Bu anlamda, dünyada oldukça yüksek tüketim oranına sahip olan süt ürünleri, fonksiyonel gıda üretiminde önemli bir yer bulmaktadır. Yapılan çalışmalar fenolik bileşikler ile zenginleştirilmiş süt ürünlerinin tekno-fonksiyonel, biyo-fonksiyonel ve duyuşsal özelliklerinin oldukça geniş bir yelpazede değiştii sonucunu doğurmaktadır. Bu nedenle, gıda bilimi ve teknolojisi açısından bakıldığında, fenolik bileşiklerin gıdaların temel bileşenleri ve de özellikle proteinler ile etkileşimleri büyük önem taşımaktadır. Ancak, sütün minör bileşenleri arasında yer alan ancak birçok proses için büyük önem arz eden enzimler ile fenolik bileşiklerin etkileşimlerini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında, fenolik bileşikler ile süt endüstrisinde büyük önem taşıyan plazmin ve kimoşin enzimleri arasındaki etkileşimler ve bu etkileşimlerin peynir yapımı ve olgunlaştırma süreçlerine etkisi incelenmiştir. Mevcut çalışmanın ilk aşamasında, farklı kimyasal yapıya sahip fenolik bileşiklerin plazmin enzimi üzerine olası inhibe edici etkisi ve inhibisyon mekanizmasının belirlenebilmesi amacı ile plazmin-fenolik etkileşimleri moleküler yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında tez kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin kimoşin aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Model sistemlerde yürütölen çalışmaların ardından sözü edilen etkileşimlerin oldukça dinamik bir yapı olan peynir matrisinde hangi sonuçlara yol açabileceğinin belirlenmesi amacı ile son aşamaya geçilmiştir. Çalışmanın son aşamasında, fonksiyonel süt ürünleri üretiminde kullanılabilir fenolikçe zengin bir ekstrakt olan yeşil çay ekstraktının (YÇE), peynir yapımı sürecinde kimoşin aktivitesi üzerine ve 60 günlük olgunlaşma sürecinde ise kimoşin ve plazmin enzimi üzerine etkisi, laboratuvar ölçekli üretilen minyatür peynirlerde incelenmiştir. Fenolik bileşikler ile plazmin ve kimoşin arasındaki etkileşimlerin peynir yapımı ve peynirin olgunlaşma süreçlerinde yer alan proteoliz mekanizmaları üzerine etkisi belirlenmiştir.

Bu tez çalışması ile, literatürde oldukça fazla araştırmacı tarafından incelenen fenolik bileşiklerin yol açtığı enzim inhibisyonu, süt endüstrisi için önem taşıyan proteolitik enzimlere özgü olarak değerlendirilmiştir. Fenolik bileşikler ile zenginleştirilmiş peynir üretiminde, fenoliklerin proteinlerle olan etkileşimlerin yanı sıra, proteolitik enzimler ile

etkileşiminin de son ürün karakteristiklerine etki edebilecek şekilde enzim aktivitesinde değişimlere yol açabileceği belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Süt Endüstrisi

Enzimler, sahip oldukları katalitik nitelikler ve seçicilikleri ile biyokimyasal süreçlerin merkezinde yer almaktadırlar. Aktivite gösterdikleri tepkimelerde, enerji aktarımı ve korunumunda, gıda bileşenlerinin yıkımında ve biyolojik makro moleküllerin sentezinde anahtar rol üstlenmektedirler. Diğer yandan bazı hastalıkların ortaya çıkmasında ve bazılarının da ortadan kalkmasında, enzimlerin son derece önem taşıdığı da bilinmektedir [10]. İnsan yaşamı için olmazsa olmaz süreçlerden; sindirim, sinir sinyallerinin iletimi, kasların kasılması gibi pek çok işlev bu biyolojik katalizörler olmadan; yeterince, etkin hızda ve süreklilik gösterecek şekilde gerçekleşmemektedir [11]. Beslenme ile vücuda alınan gıdaların sindirimi sırasında enzimler, bilinen temel işlevlerini sergilemektedirler. Sindirim enzimleri olarak anılan bu enzimler, gıdalarda bulunan makro bileşenleri yıkıma uğratarak metabolik süreçlere katılmalarını sağlamaktadır. Sadece sağlık sektöründe değil; neredeyse tüm endüstri kollarında ve tarımsal süreçlerde kullanılan enzimler, süt ve süt ürünleri endüstrisi için de son derece önem taşımaktadır.

Normal şartlar altında, inek sütünün 70'den fazla endojen enzim içerdiği ve bu enzimlerden bazı istisnalar dışında hiçbirinin, sütün bileşenlerinin sentezi ve salgılanması gibi fizyolojik süreçlerde görev yapmadığı bildirilmektedir. Ancak bu enzimler, çiğ sütte mastitis varlığı (katalaz ve asit fosfataz) ve süte uygulanan ısıl işlem geçmişi hakkında bilgi vermesinin yanı sıra (alkali fosfataz, laktoperoksidaz (LPO), γ -glutamil transferaz vb.); antimikrobiyel özellikleri (lizozim ve LPO) ve sütün kararlılığı üzerine etkileri (plazmin, süperoksit dismutaz, sülfidril oksidaz) nedeniyle teknolojik açıdan oldukça büyük önem taşımaktadır [12]. Bunlardan serin proteazlar grubunda yer alan plazminin (EC 3.4.21.7); kazeinlerden α_{s1} -, α_{s2} -, ve β - kazeini hidrolize ettiği bilinmektedir. Sütte doğal olarak bulunan enzimlerin yanı sıra, sütün katma değeri yüksek olan ürünlere dönüştürülmesi süreçleri de dışarıdan enzim ilavesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan enzimler başta peynir yapımında kullanılan rennet (kimozin ve pepsin karışımı) olmak üzere; aroma ve tekstür gelişimini modifiye etmek amacıyla kullanılan proteaz ve lipazlar ile laktosuz süt üretiminde kullanılan laktaz enzimidir [13]. Proteolitik enzimler, süt endüstrisinde; peynir üretimi, peynirde olgunlaşmanın hızlandırılması, protein hidrolizatları üretimi gibi oldukça geniş bir uygulama alanı

bulmaktadır. Günümüzde çok çeşitli hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal enzim, endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır.

2.2. Fenolik Bileşikler

Doğada oldukça yaygın olarak bulunan ve fitokimyasallar olarak anılan fenolik bileşikler, bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Bu bileşikler, enzim aktivitesi modülatörü ve/veya bileşen olarak antioksidan ağında aktiviteleri ile önemli rollere sahip olan ve basit fenolik asitlerden flavanoid polimerlere kadar geniş bir aralıkta farklı yapılarda bulunan kimyasal bileşiklerdir [14]. Bitkilerde 8000' den fazla fenolik bileşik karakterize edilmiştir [15]. Bunlardan 500 kadarının günde 1 mg' ın üzerinde tüketildiği sanılmaktadır [16]. Bunun yanı sıra hücre/hayvan çalışmaları sonucu çok geniş bir aralıkta sağlık üzerinde olumlu etkileri savunulmaktadır; antiinflamatuvar, antikanserojen, antidiyabetik, antiobezit, antiallerjik, hepato- ve gastro-koruyucu etkileri bildirilmiştir [17-23].

Polifenoller için de geçerli olduğu gibi, gıdalarla ile alınan bileşiklerin, biyomarker olarak değerlendirilebilmesi için; spesifik olması, uygun bir yarılanma ömrüne sahip olması ve alımı ile biyomarker arasında kabul edilebilir bir korelasyon olması gerekmektedir. Bu bağlamda polifenoller, gıda/ beslenme araştırmalarının gündemdeki en yaygın biyomarkerleridir [24-26]. Farmakokinetik çalışmalar, polifenollerin biyolojik sıvılara metabolit olarak girdiğini, plazmada 1-12 saat, idrarda 1-5 gün kadar bir yarılanma ömrüne sahip olduğunu ortaya koymuştur [27]. Yani fenolik bileşikler insan bedeninde birikebilmekte ve uzun bir süreçte yavaşça kan dolaşımına girebilmektedirler. Bu nedenle tartışılmaz önemde biyomarkerlerdir. Ancak gıda matrisi içerisinde varlığının ve biyoyararlanımının bilinmesi ve geliştirilmesi, metabolomda kullanılabilirliğinin öngörülebilmesi için zorunlu ve önemlidir.

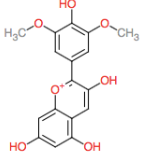
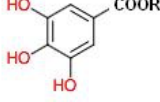
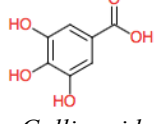
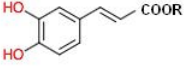
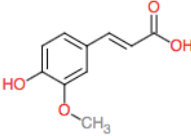
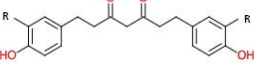
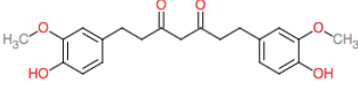
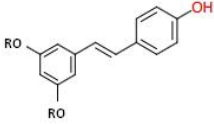
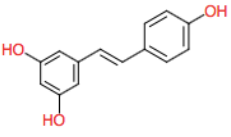
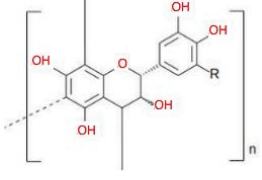
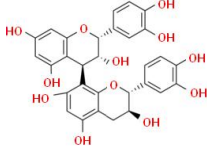
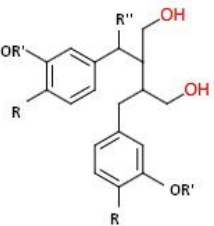
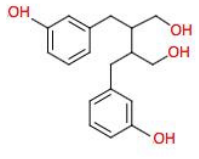
Polifenoller, bitkilerdeki yaygın varlıkları ve geniş yapısal farklılıkları nedeniyle vazgeçilemez besinsel bileşenler olarak karakterize edilen doğal bileşiklerdir. Yalnızca bitkilerde ve bazı fungal türlerde bulunurlar, buna karşın hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenemezler. Daha çok çay, şarap, meyve, sebze ve baklagillerin tüketimi ile vücuda alınan polifenollerin insan sağlığı üzerindeki yararları ortaya konulurken karşılaşılan en

önemli sorunlardan birinin polifenoller ve türevlerinin çok geniş bir çeşitliliğe sahip olmaları olduğu belirtilmektedir [28,29].

Fenolik bileşiklerin çeşitliliği karbon iskeletindeki belirgin farklılıkların yanı sıra, birincil ve ikincil yapısal bileşenlerinin değişik modifikasyonlarından (açılma, glikozillenme vb.) da kaynaklanmaktadır. Polifenoller ayrıca kondanse taninler (proantosiyandinler), hidrolize olabilir taninler, lignanlar, ligninler ve pigmentler gibi kompleks bileşikler de kapsarlar [28,30].

Çizelge 2. 1 Fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları ve aglikan formlarına örnekler

Polifenol sınıfı	Alt sınıflandırma	Kimyasal Yapı	Örnekler
Flavonoidler	Flavanonlar		 <i>Hesperetin</i> <i>Naringenin</i>
	Flavonlar		 <i>Apigenin</i> <i>Luteolin</i>
	Flavan-3-ol		 <i>Catechin</i> <i>Epigallocatechingallate</i>
	Flavon-3-ol		 <i>Kaempferol</i> <i>Quercetin</i>
	İzoflavonlar		 <i>Daidzein</i> <i>Genistein</i>
	Antosiyandinler		 <i>Cyanidin</i>

			 <p><i>Malvidin</i></p>
Fenolik asitler	Hidroksibenzoik asit		 <p><i>Gallic acid</i></p>
	Hidroksisinamik asit		 <p><i>Ferulic acid</i></p>
Kurkuminoidler			 <p><i>Curcumin</i></p>
Stilbenler			 <p><i>Resveratrol</i></p>
Taninler			 <p><i>Procyanidin B1</i></p>
Lignanlar			 <p><i>Enterodiol</i></p>

Fenolik bileşikler, temelde flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki kategoriye ayrılmaktadırlar. Flavonoidlerin alt kategorileri; heterosiklik halkanın oksidasyon derecesine göre; antosiyaninler, flavonoller, flavanlar, flavanoller, flavonlar ve izoflavonlardır. Genelde hidroksillenmiş, metoksillenmiş ve/ veya glikozillenmiş (kateşinler hariç) türevlerdir [31-33]. Bağlı şeker genelde glukoz ya da ramnozdur ve şeker bileşeni sayısı da çoğu zaman 1' dir. Günlük diyetle karşılaşılan ana flavonol kuersetindir, ortalama günlük alımı 16 mg kadardır [34]. Antosiyaninler, kırmızı renkli

meyvelerin pigmentleridir, taze meyvedeki içeriği 0.5 – 4.5 mg/ g kadardır. Asal flavonoller kateşinlerdir. Çayda yüksek miktarlarda bulunur (yeşil çay infüzyonunda 1g/ L, siyah çayda 0.5g/ L) [35]. Kateşinlerin yoğun bulunduğu diğer kaynaklar kırmızı şarap [36] ve çikolatadır [37]. Flavonlar daha az yaygındır, tatlı kırmızı biberde (luteloin) ve kerevizde (apigenin) tipiktir [34]. Flavononlar temelde turunçgillerde bulunurlar, en yaygını portakaldaki hesperidindir. İzoflavonların ana kaynağı soyadır, kuru soya fasülyesinde fazla miktarda genistein ve daidzein bulunur. Bu iki izoflavonun östrojenik nitelikleri üzerinde yaygın olarak durulmaktadır [38]. Proantosiyanidinler ise elma, armut, üzüm, kırmızı şarap, çay ve çikolatanın burukluğundan sorumludurlar. Flavonoid olmayan polifenollerden stilbenler, tüketilen bitkilerde pek yaygın bulunmazlar. Bunlardan resveratrol nöroprotektif ve antikanserojen nitelikleri nedeniyle üzerinde en çok durulan polifenollerden biridir. Lignanlar asal olarak keten tohumu ve yağında bulunur, fitoöstrojen olarak nitelendirilirler [39].

2.3. Fenolik Bileşikler ve Protein Etkileşimleri

Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımı, hala tartışma konusudur ve gıdaların işlenmesi, tüketicinin bireysel nitelikleri ve ayrıca diğer moleküller (tükürük proteinleri, sindirim enzimleri, vb.) ile etkileşimlerine bağlı olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [29,40-42]. Polifenollerin kimyasal yapısının da bu konudaki en belirleyici etmenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Yapıları; gastrointestinal sistemdeki absorpsiyon hızlarını, metabolizmalarını belirler ve buna bağlı olarak da biyolojik aktiviteleri üzerinde etkilidir. Çoğu polifenolün bağırsakta absorpsiyonunun zayıf olduğu, büyük ölçüde metabolize ve elemine oldukları da öne sürülmektedir. Aglikon yapıdakiler ince bağırsakta absorbe edilebilse de, çoğu ester, glikozid ve polimer türevlerinin absorpsiyonunun zor olduğu düşünülmektedir [43]. Polifenolik bileşiklerin etkinliklerinin büyük ölçüde gıdalar ile birlikte alındıkları içeriğe bağlı olduğu ve polifenolce zengin ekstraktlarla ya da diğer bileşikler ile bu etkinliklerin artırılacağı belirtilmektedir. Süt proteinleri bu bağlamda en uygun ‘taşıyıcı araçlar’ (vehicle) olarak değerlendirilmektedir [44].

Polifenollerin kan dolaşımındaki derişimleri, onların metabolom ve emilim sırasındaki modifikasyonlarına bağlıdır. Ağızda (özellikle flavonoidler ve proantosiyanidinler), gıda matrisinden ayrılarak prolin aminoasitince zengin tükürük proteinleri ve enzimleriyle etkileşime girerler [45]. Anılan proteinler ile etkileşimlerinde hidrojen bağlarının ya da hidrofobik bağlanmaların etkili olabileceği düşünülmektedir [46,47]. Ancak kovalent

etkileşimlerin de etkin olabileceğine ilişkin görüşler de vardır [48]. Bu nedenle çözünür polifenol-protein agregatlarının birbirleri ile daha büyük kompleksler oluşturarak presipitasyonları da söz konusu olabilir. Bunun da ötesinde, polifenol-protein etkileşimi, proteinin yapısını da değiştirebilmekte ve bu da fonksiyonel özelliklerin değişimine yol açabilmektedir.

Polifenollerin sulu çözeltilerde proteinlere bağlandığı ve kompleks oluşturduğu, bu komplekslerin niteliklerinin, her iki bileşenin de yapısına bağlı olduğu artık bilinmektedir [49]. Ayrıca, polifenollerin proteinler ile kompleks oluşturma eğiliminin moleküler boyut ve yapılarına, oksidasyon durumlarına bağlı olduğu birçok araştırmacı tarafından dile getirilmiştir [50-53]. Prolince zengin proteinlerde bunun görece daha yüksek olduğu bildirilmiştir [53]. Yapılan araştırmalarda özellikle β -kazeinin biyoaktif taşıyıcı ajan olarak en uygun model olduğu gözlenmiştir [54]. Protein-fenolik etkileşimlerinin en tipik örneği çaya süt katılmasıdır. Bu durum için, literatürde farklı görüşler söz konusu olmakla birlikte, kateşinlerin biyoyararlanımında olumsuz bir sonuç ortaya çıkmaksızın, süt proteinleri ile kateşinlerin kompleks oluşturmaları söz konusudur ve süt proteinlerinin iyi bir biyoaktif bileşik taşıyıcısı olduğu ortaya konulmuştur [55].

Proteinlerin flavonoidlere bağlanmasında birkaç kritik yapısal unsurun önemli olduğu bildirilmektedir. Bunlar içerisinde en çok üzerinde durulan aminoasit kompozisyonudur. Prolin, flavonoidlerin halka yapılarının katlanmasında (stacking) ve Pro-Pro tekrarlarıyla prolil kalıntılarının halka yapıyı etkilemesi sonucu etkileşime girdiği bilinmektedir. Ayrıca Phe, Tyr, Arg, His aminoasitlerinin de bu bağlamda önemi vurgulanmaktadır. Proteinin konformasyonunun da etkileşimde belirleyici olduğu savunulmaktadır. Düzensiz (random) yapının, globüler yapıya göre daha fazla etkileşim sergilediği öne sürülmektedir. Ayrıca ortam pH'ının pI'ya yakın olduğu değerlerde, protein bağlanma afinitesinin çok daha yüksek olduğu bildirilmektedir [56, 57]. Polifenollerin protein ve peptidlere hem hidrofobik hem de hidrojen bağlarıyla bağlanarak çözünür ve çözünmez kompleksler oluşturduğuna, bağlanmanın hem aktiviteyi hem de duyuşal özellikleri etkilediğine ilişkin verilere rastlanmaktadır. Anılan polifenol-protein etkileşiminin sağlık açısından bir diğer olumlu niteliğinin de duyarlılık artışı ya da semptomatik düzeyde gıda alerjisini modüle ettiği [58]. Flavonoik asitler ile proantosiyanidinlerin bağlanmasının, yer fıstığı alerjenlerinin daha düşük tepkime vermesine yol açtığı gözlenmiştir [59, 60]. Polifenollerin etkileşime girdikleri proteinlerin ikincil yapılarını etkilediği, ikincil

yapıda ortaya çıkacak bir değişikliğin de alerjenitede konu olan epitoplara, bağışıklık sistemi tarafından tanımlanmalarında kritik olduğu bilinmektedir [61].

Fenolik bileşikler ve süt proteinleri arasındaki etkileşimin teknolojik açıdan değerlendirildiği çalışmalarda resveratrol, kurkumin ve kateşinler gibi biyoaktif bileşenlerin sütün ısıl dayanıklılığını artırdığı belirlenmiştir [62]. Ayrıca biyoflavonoidlerin margarin ve süt tozu gibi ürünlerde oksidatif ransiditeyi azalttığını belirten çalışmalara rastlanmaktadır. Bazı fenolik bileşiklerin süt ürünlerinin mikrobiyal kararlılık ve köpürme özelliklerini geliştirdiği de belirtilmiştir [63]. Han ve ark. [64], peynir üretiminde flavonoidlerin ingrediyen olarak kullanılabilirliğini araştırmış, ve bu bileşiklerin peynirde radikal sönümleyici etkisi olabileceği ve bunun da antikanserojen etkiyi geliştirebileceğini bildirmiştir.

Fenolik bileşiklerle zenginleştirilmiş süt ürünlerinin yanı sıra; süt proteinleri, flavonoid çalışmaları için eşsiz özelliklere sahip proteinler olarak karşımıza çıkmaktadır. Peyniraltı suyunun ekonomik değerinin düşük olması nedeniyle de serum proteinlerinin biyoaktif bileşenlerin taşınmasında kullanılabilirliği araştırma konuları içerisinde yer almaktadır. Sütte bulunan serum proteinlerinden β -laktoglobulinin, hidrofobik molleküllerin etkileşime girebileceği bir hidrofobik bölgeye sahip olması nedeniyle bazı biyoaktif bileşenlerin taşınımında kullanılabilirliği öne sürölmektedir [65]. Sütteki kazein fraksiyonlarından β -kazein ise midede çok çabuk sindirime uğradığından ve yapısal özellikleri açısından, ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında ve biyoaktif bileşenlerin vücuda alınmasında kullanılabilirliğindedir [66].

Flavonoidler ile proteinler arası bağlanmanın, proteinin yapısını değiştirdiği birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Hasni ve ark. [67] yaptığı çalışmada β -kazein ve α -kazein ile çay flavonoidlerinin etkileşimi sonucu, hidrojen bağlarının oluşmasıyla proteinlerin ikincil yapılarında değişiklik oluştuğunu belirtmiştir. Kanakis ve ark. [56] ise β -laktoglobulin ve yeşil çay kateşinlerinin etkileşiminde, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimlerin önemli olduğunu ve kateşinlerin proteinlere bağlanma derecelerinin yapıdaki –OH grubu sayısı arttıa arttığını rapor etmiştir. İnsan ve sığır serum albümini ile yapılan bir çalışmada kateşin ve epikateşin ile etkileşimin, β -laktoglobülindeki α -heliks yapıyı kuvvetlendirdiği, buna karşın β -pilili yapıların ise kararlılığını azalttığı belirtilmiştir [68]. Farklı hidroksilasyon ve metilasyon derecelerine sahip flavonoidlerin

sığır serum albümini (BSA) ile etkileşiminin incelendiği bir çalışmada, flavonoidlerin BSA'nın hidrofobik kısmına bağlanabileceği sadece bir adet bağlanma bölgesine sahip oldukları; bu bağlanmanın flavonoid molekülünün hidroksilasyon derecesi ile artarken, metilasyon derecesi ile azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca flavanoidin B halkasındaki –OH gruplarının, A halkasındakilere göre bağlanmada daha etkin olduğu sonucuna ulaşılmıştır [69]. Ancak metilasyon derecesinin, flavonoidlerin proteinlerle etkileşimini artırdığı belirtilen çalışmalar da mevcuttur [70]. Yeşil çay flavanoidlerinden epigallokateşin gallatın (EGCG), α -kazein ve β -kazein ile etkileşiminde proteinin prolin içeriği ile hidrofobisitenin bağlanma üzerine etkisi de yapılan bir çalışma ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada literatürde yer alan yaygın kanıya paralel olarak flavonoidin gallik asit esteri halindeki formlarının proteinler ile daha fazla etkileşime girdiği belirtilmiştir. Ayrıca, flavonoid dimerlerinin (prosiyanidin A1 ve prosiyanidin B) esnekliği ile etkileşimler arasında doğrudan korelasyon bulunmadığı da belirtilmiştir. Prolin içeriği α -kazeinden daha yüksek olan β -kazeinin her zaman daha fazla bağlanma gerçekleştirmediği; hatta bazı durumlarda flavonoidler ile etkileşimin görülmediği sonucuna ulaşılmış ve protein-flavonoid etkileşimlerinde prolin içeriğinin yanısıra etkin olabilecek birçok faktör olduğu belirtilmiştir [71]. Üzüm, şarap ve elmadaki önemli fenoliklerden olan resveratrol ile sodyum-kazeinat etkileşimlerinin incelendiği bir başka çalışmada ise resveratrolün sodyum-kazeinat ile güçlü etkileşimlerde bulunduğu ve bağlanmanın hem hidrojen bağları hem de hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığı belirlenmiştir. [72].

Zerdeçalda bulunan başlıca kurkuminoit olan kurkumin ile β -laktoglobülin arasındaki bağlanmanın araştırıldığı bir çalışmada ise β -laktoglobulinin kurkumin ile etkileşimi sonucu yapısında değişiklik meydana geldiği ve bağlanma bölgelerinin farklı pH'da farklılık gösterdiği rapor edilmiştir [73]. Yüksel ve ark. [74], sütün yeşil çay ekstraktı ile zenginleştirilmesi amacıyla yaptığı çalışmada, yeşil çay flavonoidleri ve süt proteinleri arasındaki etkileşimin, kazein misellerinin yüzey hidrofobisitesinde azalmaya yol açtığı, dolayısıyla bu etkileşimde baskın mekanizmanın hidrofobik interaksiyonlar olduğu sonucuna ulaşmıştır. Proteinlerin flavonoidler ile etkileşiminde proteinin ikincil ve üçüncül yapılarının değişebileceği ve böylelikle proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin de bu interaksiyonlardan etkilenebileceği sonucuna ulaşılmıştır [75]. Protein-flavonoid etkileşimlerinin flavonoidin antioksidan aktivitesine etkisinin incelendiği araştırmalarda çelişkili sonuçlar yer almaktadır. Almajano ve ark. [76], süt proteinleri ile yeşil çay

kateşinleri arasındaki etkileşimin toplam antioksidan aktiviteyi artırdığını belirlemişlerdir. Buna karşın Belscakve ark. [77] ile Ryan ve Petit [78] ise bu etkileşimlerin kovalent olan ve olmayan bağlarla antioksidan aktiviteyi maskeleydiğini rapor etmişlerdir.

Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımının incelenmesinde in vitro denemeler in vivo denemelere göre daha sık çalışılmakla birlikte, in vitro ve in vivo denemeler arasında farklılıkların olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle flavonoidlerin insan sağlığı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda in vivo denemelerin daha doğru sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Keogh ve ark. [79], yaptığı çalışmada süt proteinleri ile kakao fenoliklerinin birlikte alınmasının vücuttaki emilimde önemli değişikliklere yol açmadığını rapor etmiştir. Benzer şekilde Leenen ve ark. [80] de süt ve yeşilçay flavonoidleri etkileşiminin plazmadaki antioksidan aktivite değeri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Ancak, Duarte ve Farah [81] ise kahve ve sütün birlikte tüketiminin kahve flavonoidlerinin biyoyararlanımını azalttığını rapor etmişlerdir. Stodajinovic ve ark. [82] ise yeşil çay, kahve ve kakao fenolikleri ile β -laktoglobülin etkileşiminin, proteinin sindirilebilirliğini in vitro koşullarda azalttığını ve antioksidan aktiviteyi de maskeleydiğini belirtmiştir. Ancak protein-flavonoid etkileşiminin bu etkileri henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir.

2.4. Fenolik Bileşikler ve Enzim Etkileşimleri

Fenolik bileşiklerin protein yapısında olan enzimler ile de etkileşime girerek aktivitelerinde değişikliğe yol açabilecekleri uzun yıllardır araştırılan konular arasında yer almaktadır. Bu alanda yapılan çalışmaların büyük kısmı sindirim enzimlerini ve metabolik enzimleri kapsamaktadır. Kateşinlerin; laktoperoksidaz (LOX), α -amilaz, pepsin, tripsin, lipaz gibi enzimler ile etkileşime girip presipitat oluşturduğu ve anılan enzimleri inhibe ettiği düşünülmektedir. Polifenollerin gastrointestinal sistemde protein sindirimini etkileyebilecek düzeyde proteazları inhibe ettiği öne sürülmektedir [83, 84]. Ayrıca polifenollerin sağlık üzerindeki olumlu (koruyucu) etkisinin, okside kateşinler ile proteinler arasında çözünür olmayan kompleksler oluşturma eğilimiyle ilintili olduğu da düşünülmektedir [85]. Bunun yanı sıra, epigallokateşingallat (EGCG), epikateşingallat (ECG) gibi, epikateşin (EC) ve epigallokateşin (EGC)' den daha fazla ester bağlama

yetisindeki kateşinlerin; LOX, pepsin ve tripsin gibi enzimler ile presipitat oluşturma yeteneğinin daha fazla olduğu gözlenmiştir [86].

Diyabet ve obezitenin tüm dünyada dramatik olarak arttığı bir gerçektir. Diyabetin temel karakteristiği, kanda kontrol edilemeyen glikoz düzeyi olarak tanımlanabilecek, hiperglisemidir. Kandaki glukoz düzeyinin kontrol edilememesi, insülin etkinliğine direnç ya da istenmeyen insülin salgılanmasından kaynaklanan, açlık glisemisi ve glukoz toleransı gibi komplikasyonlara yol açmaktadır [43, 87]. Son 25 yılda kandaki glukozun etkin olarak kontrolü ve buna bağlı sağlık sorunlarının önlenmesi üzerine birkaç öncü yöntem ortaya konulmuştur ve sonuçta sentetik ilaçlarla karşılaştırıldığında, anti-diyabetik ajan olarak doğal bileşiklerin ön plana çıkması sağlanmıştır [88, 89]. Bu bağlamda yeşil çay ekstraktları ve içeriğindeki kateşinlerin, diğer niteliklerinin yanı sıra anti-diyabetik etkileri de tartışılır olmuştur [89, 90]. Ancak bu etkileşime ilişkin bilimsel veriler, çay kateşinlerinin metabolizmasının anlaşılmasını sağlayacak bilgi yetersizliğine bağlı olarak, hala çok kuvvetli değildir. Yine de çay kateşinlerinin α -amilaz inhibitörü olduğuna ilişkin çalışmalara rastlanmaktadır [31]. Benzer sonuçlara antosiyanin için de ulaşılmıştır [91].

Daha önce de dile getirildiği gibi; çilek, vişne, kiraz, ve kıvılcık gibi kırmızı renkli meyveler antosiyanin kaynağıdır. Antosiyaninlerin fonksiyonel metabolizmaları ve anti diyabetik etkileri ortaya konulmuş olmakla beraber, amilaz inhibisyonuna ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır [92]. Ancak, farklı bitkisel kaynaklardan alınan polifenollerin insan tükürük amilazı üzerine potansiyel inhibe edici etkisi olduğu savunulmaktadır [93]. İnsanlarda karbonhidrat sindiriminde görevli bir diğer enzim olan α -glikozidaz; ince bağırsak epitelinde bulunup disakkarit hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Bazı polifenollerin, özellikle flavonoidlerin bu enzimleri de inhibe ettikleri gözlenmiştir [94,95]. Bu araştırmalara göre kalitatif/kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) çalışmaları;

1. A-C halkalarındaki C5 ve C7 pozisyonundaki ve B halkasındaki C3' ve C4'-pozisyonundaki hidroksil gruplarının, anılan enzimler üzerindeki inhibisyon aktivitesini artırdığını,
2. Serbest hidroksil gruplarının "bloklanmasına" neden olan metileasyon ve metoksilasyonun inhibisyon aktivitesini azalttığını,

3. Her ne kadar glikolizasyon, serbest hidroksil sayısını artırsa da, flavonoid glikozidlerinin inhibisyon aktivitesinin, aglikon formlarından daha az olduğunu,
4. C2-C3 bağlarının doymamışlığından kaynaklanan flavonoidlerin yapısal planarlığının (düzlemsel yapı sergilemelerinin) inhibe edici aktivitesi artırdığını,
5. Galloik kateşinlerin, diğerlerinden daha yüksek aktivite gösterdiğini,
6. İnhibisyon aktivitesinin C2 pozisyonuna bağlanan flavonoidlerde, C3 pozisyonuna bağlanarlardan (izoflavonlar) daha belirgin olduğunu, ortaya koymuştur [95].

Hidrojen bağı donör ve akseptör sayısındaki artışın, daha yüksek insan α -amilaz inhibisyonuna yol açtığı, in vitro olarak gözlenmiştir. Bunun da ötesinde lipofiliklik göstergesi olan XlogP3 katsayısının inhibisyon düzeyiyle ters ilişkili olduğu olduğu belirtilmektedir. Bu bulgu, flavonoidlerin α -amilaz ile etkileşiminin hidrofobik değil hidrojen bağlarıyla gerçekleştiği yorumunu güçlendirmektedir. [96]. Bir diğer sindirim enzimi olan, pankreatik lipaz, yağca zengin bir diyet sonrasında trigliseritlerin bağırsakta absorpsiyonu ve sindiriminde önemli rol oynamaktadır. Obezitenin önlenmesi/ giderilmesi yaklaşımlarından biri de lipaz aktivitesinin geciktirilmesi/ engellenmesidir [97]. Polifenollerin, birkaç mekanizma ile sergiledikleri, antiobezite potansiyellerinden biri de pankreatik lipaz inhibisyonudur [97, 98]. Ancak halen izole flavonoidler ya da flavonoid standartlarının (kateşin derivatları hariç) anılan etkisine ilişkin kesin veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, flavan-3-ollerin; flavonoller, isoflavonlar, flavonlar ve flavononlardan daha güçlü lipaz inhibisyonu sergilediğini bildirilmektedir [99, 100]. Ayrıca, kateşin ve epikateşinin; galloil formlarına göre daha az aktif bileşikler olduğu ve hatta ester bağlarının sayısının artmasıyla daha yüksek lipaz inhibisyon aktivitesi gösterdikleri savunulmaktadır [99].

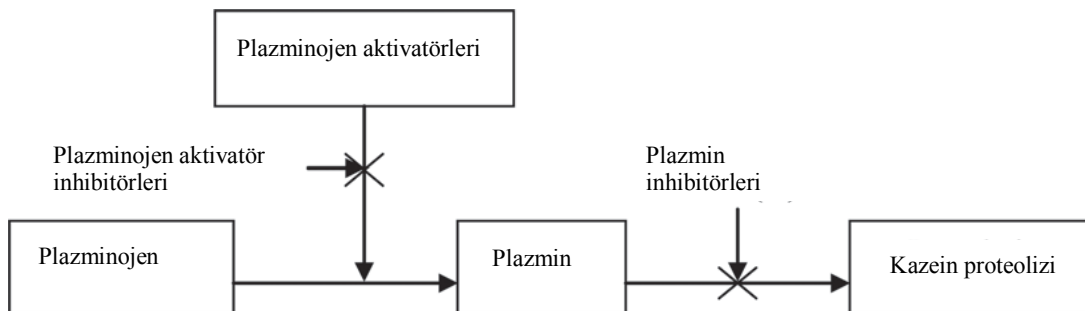
Flavonoidlerin C3-pozisyonundaki hidroksil gruplarının artmasının lipaz-inhibisyonu potansiyeline katkıda bulunabileceği de dile getirilmektedir. Flavan-3-ollerin C3-pozisyonundaki galloil grubunun, bu etkide bir artış sağladığı da gözlenmiştir. Genisteinde olduğu gibi C3' deki hidroksil grubunun, benzen halkasıyla yer değiştirmesi, inhibisyon potansiyelini belirgin olarak düşürmektedir. Kuersetinin C3-pozisyonunda farklı uzunluklarda değişik açıl zincirleriyle esterleşmesinde; açıl zincirinin uzunluğu ile lipaz inhibisyonu etkinliği arasında çok belirgin bir doğrusal ilişki olduğu gözlenmektedir

[101]. C3-pozisyonundaki düzlemselliğin, hidroksilasyonun ve galloilasyonun, lipaz inhibisyonu aktivitesini etkileyeceği savunulmaktadır [100].

Karbonil redüktaz1 enzimi (CBR1), kısa zincirli dehidrogenaz/ redüktaz grubundan, insan dokusunda bulunan ve birçok ksenobiyotiğin redüksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bazı flavonoidlerin, stilbenlerin ve kurkuminoidlerin CBR1 aktivitesinin inhibisyonunda potansiyeli olduğu düşünülmektedir [102]. Soyadaki tripsin inhibitörünün, polifenoller ile inaktivasyonu da son bir kaç yılın göze çarpan araştırma konularından biridir, EGCG' nin bu konuda da yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir [103]. Laktaz enzimi de bir (brush border) sindirim enzimidir, laktozun hidrolizini katalizler. Bazı flavonoidlerin (kuersetin, genistein) laktazın inhibisyonuna yol açtığı ancak anılan inhibisyon düzeyinin, tükürük salgısında bulunan prolince zengin proteinler (PRP) varlığında azaldığı belirtilmiştir [104].

2.5. Plazmin Enzim Sistemi ve Süt Ürünleri

Plazmin, sütte plazmin enzim sistemi olarak adlandırılan bir sistem içinde yer almaktadır. Bu sistemin elemanları; plazmin, plazminojen, plazminojen aktivatörleri, plazminojen aktivatör inhibitörleri ve plazmin inhibitörleridir (Şekil 2.1). Sütte, plazmin genellikle inaktif formu olan plazminojen halinde bulunur ve sütte bulunan plazminojen miktarının plazminden 2-30 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir [105]. Plazmin, temel olarak 2 tip aktivatör ile (ürokinaz tipi (uPA) ve doku plazminojen aktivatörleri (tPA)) inaktif plazminojen formundan aktif hale geçmektedir [106]. tPA'nın sütte kazein misellerine bağlı bulunduğu buna karşın uPA'nın somatik hücreler ile etkileşim halinde olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2. 1. Sütte plazmin enzim sistemi [106]

Plazmin ve plazminojen kazein miselleri ile assosiyel halde iken, plazmin inhibitörleri ise sütün serum fazında bulunmaktadır [107, 108]. Plazmin sistemi oldukça dinamik bir sistem olup, bu sistemin elemanları birbirleri ve sütte bulunan diğer bileşenler (kazein miselleri, serum proteinleri) etkileşim halindedirler ve bu etkileşimler ile birlikte sütün işleme ve depolama şartları da artan ya da azalan proteolitik aktiviteye yol açabilmektedir.

2.5.1. Plazmin

Plazmin (EC 3.4.21.7), sütte bulunan bir serin proteazdır ve 37°C'de optimum 7.5 pH'da çalışmaktadır. Sütte bulunan plazmin derişiminin 0.1-0.7 mg·L⁻¹ olduğu belirtilmiştir [106]. Plazminin katalitik bölgesi C-terminalinde yer almakta ve 598, 641 ve 746. aminoasitleri (His-Asp-Ser) içermektedir [109]. Lizin bağlanma bölgelerindeki elektrostatik etkileşimler, plazminin düşük sıcaklıkta kazein misellerinden disosiyel olamamasını açıklarken, pH<4.6 olduğu durumlarda plazminin kazein misellerinden kolaylıkla ayrılabilirdiği belirtilmektedir [110].

Plazmin, lizin ve az miktarda da arginin aminoasitlerinden sonraki peptit bağlarına spesifik bir proteazdır. Sütte plazminin birincil substratı β-kazeindir. β-kazeinin Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ ve Lys₁₀₆-Glu₁₀₇ bağlarının plazmin tarafından hidrolizi sonucu, proteoz pepton ve γ-kazeinler oluşmaktadır [111]. Plazminin, α_{s2}-kazein üzerindeki proteoliz hızının β-kazein hidrolizi ile yaklaşık olarak aynı olduğu belirtilmektedir. Buna karşın, α_{s1}-kazeinin proteolizi daha yavaş ilerlemektedir. Plazminin, diğer kazein fraksiyonu olan κ-kazein üzerine proteolitik etkisinin çok az düzeyde olduğu ya da aktivite göstermediği belirtilmiştir [112]. Kazeinlerin plazmin tarafından hidrolizi sonucu oluşan fraksiyonların, UHT sütlerde depolama sürecinde değıştiği ve artan depolama süresince daha fazla kazein fraksiyonu oluştuğu da rapor edilmiştir [113]. Serum proteinlerin plazmin tarafından proteolizine yönelik sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte, bu proteinlerin globüler yapılarından dolayı proteolize dirençli olduğu belirtilmiştir [114].

2.5.2. Plazmin Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Oldukça dinamik bir protez sisteminin parçası olması nedeni ile plazminin sütteki proteolitik aktivitesi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Plazminojen aktivasyon düzeyinin yanı sıra plazmin ve plazminojen aktivatörleri inhibitörlerinin varlığı 'net plazmin aktivitesi' üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Çevresel koşullar incelendiğinde hayvanın ırkı ve yaşının plazmin aktivitesini etkilediği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, laktasyon döneminin sonlarında plazmin ve plazminojen aktivitesinin arttığı da rapor edilmiştir [115]. Ayrıca, mastitis ve yüksek somatik hücre miktarının da yine artmış plazmin aktivitesine yol açtığı bilinmektedir. Çevresel etmenlerin yanında, süt işleme ve depolama koşullarının da plazmin ve plazminojen aktivitesine etkisinin araştırıldığı birçok çalışma literatürde bulunmaktadır. Örneğin, soğuk depolama koşullarında plazmin ve plazminojen aktivatörlerinin aktif halde olması nedeni ile proteoliz hızının arttığını belirten çalışmalar olmakla birlikte [106], oda sıcaklığında depolamaya kıyasla soğukta (5°C) depolanan sütlerde plazminin daha az aktivite gözlendiğini belirten çalışmalar da mevcuttur [116].

Plazmin, 37°C'de optimum aktivitesini pH 7.5'da gösterse de, geniş bir pH aralığında aktivitesini devam ettirebilmektedir. Ancak pH düşüşü ile birlikte kazein misellerinin dissosiasyonu sonucu plazmin ve plazminojenin misel yapısından serum faza geçtiği bildirilmiştir [106].

Isıl işlemin, sütte plazmin aktivitesi üzerine en çok etki eden etmenlerden biri olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörlerinin ısı dayanımı yüksek iken, plazmin inhibitörleri ve plazminojen aktivatör inhibitörlerinin ısıya karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Plazminin tamamen inaktive olabilmesi için 80°C'de 10 dakika ısı işleme tabi tutulması gerekmektedir [117]. LTLT (Low Temperature Long Time, 60-62.5 °C/ 30 dk) ısı işlem uygulanmış sütlerde plazmin ve plazminojenin aktivitesinde azalma meydana gelmediği, hatta uygulanan ısı işlemin plazmin inhibitörlerini inaktive etmesi ya da plazminojen denatürasyonu ile artan uPA aktivasyonu sonucu plazmin aktivitesinin bir miktar arttığını belirten çalışmalar mevcuttur [118,119]. HTST (High Temperature Short Time) ve UHT (Ultra High Temperature) işlemlerinin sonucunda ise plazmin aktivitesinin azaldığı, ancak halen %20-40 düzeyinde aktivitesini devam ettirebildiği rapor edilmiştir [106]. Görece yüksek ısı işlem normlarında azalan plazmin aktivitesine, sütte bulunan β -laktoglobülinin

denatürasyonu ve bunu izleyen β -laktoglobülinin-plazminojen etkileşimlerinin katkısı olduğu da düşünülmektedir [106]. Plazmin enzim sisteminin karmaşık ve dinamik yapısı ve aynı zamanda ısıl işlem ile sütte meydana gelebilecek reaksiyonların da karmaşıklığı nedeni ile ısıl işlemin plazmin aktivitesi üzerine etkisinin bir bütün olarak düşünülmesi gerekliliğinin, bu konuda kesin kaniya varmayı zorlaştırdığı da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Süte uygulanan homojenizasyon işleminin (200MPa) ise plazmin aktivitesinde az da olsa bir miktar azalmaya yol açtığı belirtilmiştir [120].

Peynirin olgunlaşma sürecindeki temel reaksiyonlardan proteolize katkısı nedeni ile, peynir üretim koşullarının plazmin aktivitesi üzerine etkisi de birçok araştırmaya konu olmuştur. Örneğin peynir pıhtısı haşlama sıcaklığı arttıkça plazmin aktivitesinin, plazminojen aktivasyonuna bağlı olarak, arttığı rapor edilmiştir [106]. Peynir üretiminde tuzlama aşamasında kullanılan tuz miktarının plazmin aktivitesine etkisi de birçok çalışma tarafından incelenmiş ancak çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Tuz konsantrasyonunun plazmin aktivitesi üzerine etkisinin önemsiz düzeyde olduğunu belirten çalışmalar mevcut olmakla birlikte [121], düşük orandaki (%2) tuz derişiminin plazmini stimule ettiği, buna karşın yüksek tuz derişiminin plazmin aktivitesinde azalmaya yol açtığını da rapor edilmiştir [122]. Süzme peynir üretiminde kullanılacak süte uygulanan ultrafiltrasyon işleminin ise plazmin aktivitesinde ve olgunlaşma süresinde plazmin kaynaklı proteoliz hızında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir [123]. Bu durumunun en temel nedeninin, UF işlemi ile plazmini inhibe ettiği bilinen serum proteinlerin ve diğer plazmin inhibitörlerinin pıhtıda kalması olduğu düşünülmektedir. Mikrofiltrasyon işleminde ise serum proteinlerin büyük ölçüde permeata geçmesi; buna karşın plazmin ve plazminojenin pıhtıda kalmasının, plazmin aktivitesinde artışa yol açtığı düşünülmektedir.

2.5.3. Süt Ürünlerinde Plazmin Aktivitesi

Plazmin aktivitesi süt ve süt ürünlerinde, aktivite düzeyine göre, istenen ya da istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir. Plazminin, ısıl işleme dirençli bir enzim olması, hatta kimi araştırmacılara göre reaktivasyona bağlı olarak ısıl işlem sonrasında da aktivitesinin saptanabiliyor olması, bu enzim üzerinde hala yoğun olarak devam eden araştırmaların temel nedenlerinden biridir. Plazmin aktivitesi ile UHT sütlerde depolama aşamasında asitlik gelişmeden jel oluşumu (age gelation) görülebilmekte ve bu durum süt

endüstrisinde önemli kayıplara yol açan teknolojik bir kusur olarak nitelendirilmektedir. Ancak, UHT sütlerde plazmin aktivitesine ilişkin verilerin çelişkili olduğu da görülmektedir. Bu çelişkinin en önemli nedeninin, çalışmalarda uygulanan proses koşullarının, depolama koşullarının ya da sütte başlangıçta bulunan plazmin düzeyinin farklılığı ve çeşitliliği olduğu düşünülmektedir. UHT işleminden önce genellikle uygulanan 'ön ısıtma' (85-90°C/30-60 sn) işleminin ise sütte jelleşmeyi geciktirdiği ancak plazmin aktivitesini tamamen elimine etmediği belirtilmiştir [106].

Yüksek düzeydeki plazmin aktivitesinin, peynir üretiminde de istenmeyen sonuçlara yol açabileceği bilinmektedir. Özellikle ısı işlem görmüş peynir çeşitlerinde (pıhtısı haşlanmış ve pişirilmiş), pıhtılaştırıcı ajanlar (rennet) büyük ölçüde denatüre olduğundan, plazmin birincil proteolizden sorumlu enzim rolünü üstlenmektedir. Plazminin yüksek aktivitesinin peynirde yol açtığı sorunların başında, proteoliz sonucu yüksek düzeyde oluşan hidrofobik peptitlerin olgunlaşma aşamasında acı tada yol açması gelmektedir [123]. Mara ve ark. [124], dışarıdan plazmin ilavesi ile üretilen peynirlerde, yüksek miktardaki plazmin ilavesinin pıhtı kesim süresi ve sıkılaşıma süresini uzattığı; pıhtı sıklığını ve peynir verimini azalttığı yönünde bulgular elde etmişlerdir. Ancak düşük miktardaki plazmin ilavesinin belirtilen parametreler üzerindeki etkisinin önemsiz seviyede olduğunu da rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Srinivasan ve Lucey [125] de artmış plazmin aktivitesinin peynir jellerinin reolojisi üzerinde etkili olduğu ve peynir verim ve tekstürünü olumsuz etkilediği sonucuna ulaşmışlardır. Buna karşın, aynı laktasyon dönemi içinde, 380 adet inek sütünün incelendiği bir çalışmada, plazmin miktarı ile bu sütlerden üretilen peynir jellerinin sıklığı arasında bir korelasyon bulunamamıştır [126].

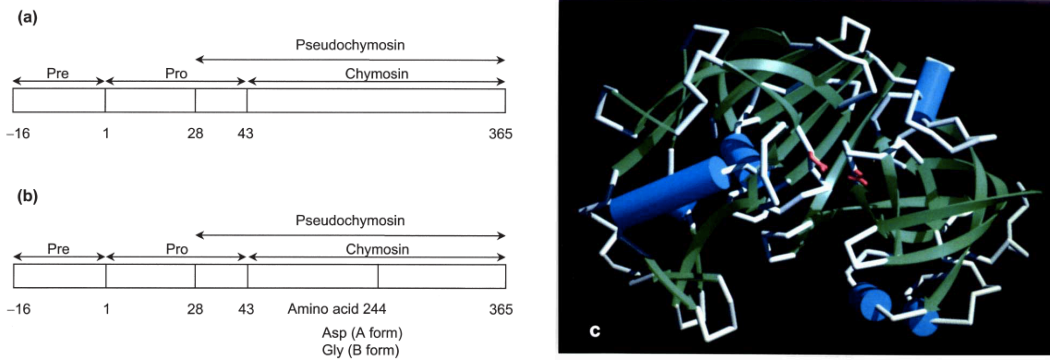
Bahsedilen olumsuz etkilerin yanı sıra, plazmin enziminin peynirin olgunlaşma sürecine katkısı da genel anlamda kabul edilmektedir. Yine Cheddar ve İsveç tipi peynirlerde, olgunlaşma sürecinde azalan plazmin aktivitesini dengelemek amacı ile, plazminojen ilavesi ile olgunlaşma sürecinin hızlandırılabilirdiği rapor edilmiştir [106]. Özetlemek gerekirse, plazmin aktivitesi peynir aroma ve tekstürünün oluşması için elzem faktörlerden biri olmakla birlikte, plazmin aktivitesinin yüksek düzeyde olması hem peynir yapımı hem de olgunlaşma aşamasında istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir. Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen çelişkili verilerin; çevresel etmenlerin, proses

parametrelerinin ve kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanabileceği de belirtilmektedir.

2.6. Kimozin ve Süt Ürünleri

2.6.1. Kimozin

Kimozin (EC 3.4.23.4), yeni doğan buzağının ön midesinden izole edilen bir aspartik proteaz olup temel olarak hücre içinde pre-prokimozin şeklinde salgılanır. 16 aminoasitlik hidrofobik kısmı sinyal sekansıdır ve yapıdan ayrılarak prokimozini oluşturur. Kimozinin inaktif öncülü olan prokimozin de midedeki yüksek asitlik sayesinde N-terminalindeki 42 aminoasitlik bölümünü kaybederek aktif kimozini oluşturur (Şekil 2.2) [127].



Şekil 2. 2. Kimozin: a) Protein yapısı b) varyantları ve c) 3-boyutlu yapısı [127, 129].

Kimozin, peynir yapımında yüzyıllardır kullanılan rennet preparatında bulunan temel enzimdir. Ticari olarak satılan rennet preparatında kimozinin yanı sıra düşük oranda da olsa pepsin enzimi de bulunmaktadır. Pepsin, bir asit proteaz olup, spesifik olmayan proteoliz ile kazeinleri hidrolize uğratması ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip olması nedeni ile acı tat oluşumuna yol açabileceğinden, yüksek düzeyde kullanımı önerilmemektedir. Kimozinin optimum pH koşulları peynir yapımında genellikle ulaşılan pH değerlerinden (4.6-5.2) daha düşük olsa da κ -kazeine olan spesifikliği nedeni ile tercih edilmektedir. Kimozinin 323 aminoasitten oluşan (MW 36.5kDA) polipeptit zincirinde dikarboksilik ve β -hidroksi rezidülerin sayısı fazla iken; az miktarda bazik aminoasit kalıntıları içerdiği rapor edilmiştir. Kimozinin A ve B olmak üzere iki temel varyantı

vardır ve bu iki varyant sadece bir aminoasitten kaynaklanan farklılığa sahiptir (Şekil 2.2). Üçüncü bir varyant olarak nitelendirilen C varyantının ise, Kimozin A'nın hidrolizi sonucu oluştuğu bildirilmiştir [127, 128]. Kimozinin sekonder yapısı çoğunlukla anti-paralel β -pilili tabakalardan oluşmakta, ayrıca az miktarda kısa heliks yapılar da içermektedir. Birincil katalitik rezidülerin Asp₃₂ ve Asp₂₁₅ olduğu düşünülmektedir. Bu rezidülerin H-bağları ile stabilize olduğu ve Asp₃₀₃ aminoasitinin de Thr₂₁₆ ile H-bağı aracılığı ile etkileşime girerek katalitik bölgenin stabilizasyonunda rol aldığı belirtilmektedir [127].

Kimozinin yanısıra, bitkisel ve hayvansal diğer süt pıhtılaştırıcı enzimlerin peynir yapımında kullanılmasına yönelik çalışmalar halen sürmektedir. Ancak bu enzimlerin enzimatik etki ve spesiflikleri farklılık göstermektedir.

Geleneksel yöntemlerde, rennet kaynağı olarak hayvanlar ve bitkiler kullanılabilir. Ancak son dönemlerde rekombine kimozin üretimi ve kullanımı oldukça yaygınlaşmış durumdadır. Rekombine rennet üretiminde en sık kullanılan mikroorganizmalar *A. niger*, *Kluyveromyces lactis* ve *E. coli*'dir. Rekombinant kimozinin, tüm özellikler açısından buzağı kimozinine benzemesinden ve saflık derecesinin yüksek olmasından dolayı olgunlaşma süresinin kusursuz gerçekleştiği belirlenmiştir. Buzağı rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin %5-50'si pepsinden kaynaklanabilirken, mikrobiyal rekombinant kimozin preparatları pepsin içermez. Bu nedenle, bu iki enzimle yapılan peynirlerin proteolizleri arasında bazı farklılıklar görülebilmektedir [130].

2.6.2. Kimozinin Etki Mekanizması ve Aktivitesi

Sütün asal proteinlerinden kazeinler, doğada bulunan globüler ve fibroz yapılardan hiçbirine tam olarak uymayan; serin kalıntıları ile esterleşmiş fosfoproteinler olup, kolloidal partiküller halinde bulunmaktadır. Kazeinlerin asal olarak, fosfoerin kalıntıları içeren 4 farklı protein molekülünden oluştuğu (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, ve κ -kazein) bilinmektedir. α_{s1} -, α_{s2} -, β - ve κ -kazein fraksiyonları, sırası ile toplam kazeinin %37, 10, 35, 12' sini oluşturmaktadır [131]. Kimozin, κ -kazeine spesifik bir enzim olup, gerçekleştirdiği sınırlı proteoliz ile κ -kazeini Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından parçalayarak para- κ -kazein ve kazeinomakropeptit (CMP) oluşumuna yol açmaktadır. Ancak, Phe-Met dipeptidinde ya da Phe-Met içeren tripeptit ya da tetrapeptitlerde kimozin aktivitesi

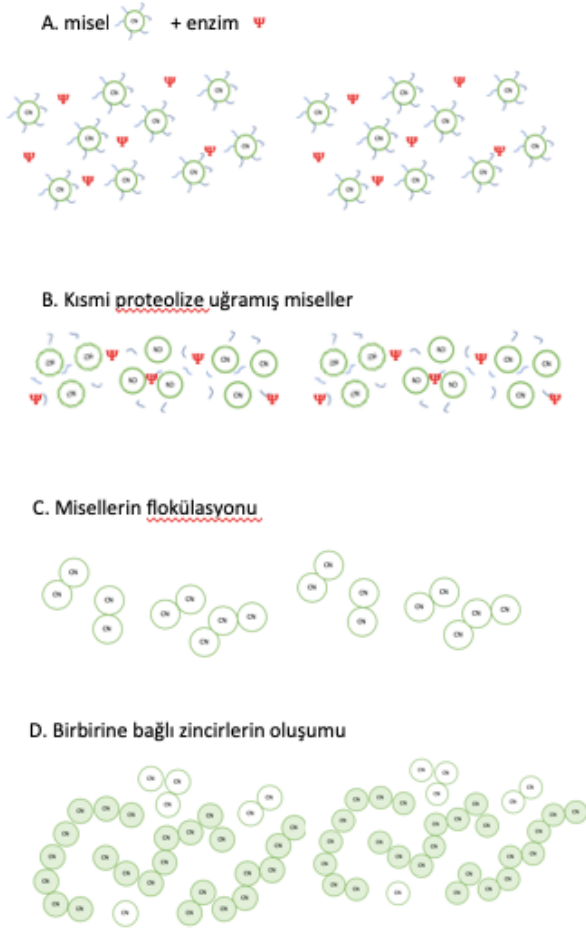
sonucu Phe-Met bağında hidroliz görülmemesi, kimozin aktivitesinin polipeptit zincirinin uzunluğu ve etrafındaki aminoasit dizilimi ile de yakından ilişkili olduğu sonucunu doğurmaktadır [127]. Kimozin, kazein misellerinin dış kısmında bulunan, sterik ve elektrostatik stabilizasyonu sağlayan κ -kazeinin su fazına doğru çıkıntı yapan C-terminalini ayırarak, Ca^{++} varlığında misellerin floküle ve agrege olmasını ve bunu izleyen süreçte peynir jelinin oluşumunu sağlamaktadır. Her ne kadar κ -kazeinin kimozinin birincil substratı olduğu bilinse de, α_s - ve β -kazeinin de kimozin tarafından bir miktar hidrolize uğradığı belirtilmektedir [122, 132]. Peynir yapımı aşamasında kullanılan sütün bileşimi, pH, ısıl işlem, iyonik g, enzim derişimi ve kaynağı, uygulanan ön işlemler gibi faktörlerin kimozin aktivitesi ve pıhtılaşma sürecini etkilediği belirtilmektedir.

2.7. Peynir retimi ve Proteoliz

Sütün peynire dönüşümünde proteoliz en önemli biyokimyasal süreçlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Sütün pıhtılaştırılması işleminde, kazeinlerin destabilizasyonu enzim (rennet) ile, izoelektrik metotla (asit ilavesi) ya da ısı ve asit uygulamasının kombinasyonu şeklinde sağlanabilmektedir. Ancak tüm dünyada üretilen peynirlerin büyük çoğunluğu dışarıdan enzim (rennet) ilavesi ile üretilmekte ve olgunlaştırma işlemi uygulanan peynirler için dışarıdan eklenen ve pıhtıda kalan rennet aktivitesi peynirin yapı ve aromasına büyük oranda etki etmektedir [3, 122]. Bu nedenle endojen ve eksojen proteolitik enzimler peynir yapımı ve olgunlaşma aşamasında büyük öneme sahiptirler.

2.7.1. Sütün Enzimatik Pıhtılaşma Süreci

Peynir üretiminin temeli olan sütün pıhtılaşma süreci (rennetlenme süreci) temel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama olan enzimatik fazda, kimozin aktivitesi ile kolloidal kararlılığını yitiren kazein miselleri, ikinci aşamada agrege olmaya başlayarak peynir jeli yapısını oluşurmaktadır.



Şekil 2. 3. Sütün enzimatik koagülasyonunun şematik gösterimi

Enzimatik aşamada, kimozen tarafından gerçekleştirilen proteoliz ile kazein misellerinin yüzeyinde bulunan κ -kazeinler, Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından parçalanarak para- κ -kazein (1-105) ve CMP (106-169) olmak üzere iki kısma ayrılır. Hidrofilik özellikte olan CMP serum faza geçerken, para- κ -kazein fraksiyonu misel yapı içinde kalmaya devam etmektedir. Enzimatik fazda gerçekleşen bu sınırlı proteoliz ile, kazein misellerinin sahip olduğu net negatif yükün yaklaşık %50 oranında azaldığı belirtilmiştir [133]. Bu değişimler ile, kazeinlerin kolloidal stabilitesini sağlayan etmenlerden olan elektrostatik ve sterik etkilerin azalmasının, kazein miselleri arasındaki çekim güçlerinin artması ve misellerin birbirine yaklaşmasına zemin hazırladığı bilinmektedir. Rennetlenmenin ikinci aşamasında ise misellerde bulunan κ -kazeinin önemli bir kısmının proteolize uğrayarak parçalanmasının ardından, sıcaklık ve Ca⁺⁺ iyon derişiminin yeterli düzeyde olması durumunda, kolloidal kararlılığını yitiren kazein miselleri birbirleriyle birleşerek gözle görülebilir pıhtı partikülleri (floküller) oluştururlar. Misel agregasyonunda, hidrofobik

etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimlerin kilit rol oynadığı belirtilmektedir [134].

2.7.2. Peynirin Olgunlaşma Süreci

Asit jeli olarak adlandırılan ve enzim ilavesi gerçekleşmeden üretilen peynirler taze olarak tüketilse de rennet ile koagüle peynir türlerinin çok büyük bir kısmı iki haftadan iki yıla kadar değişen olgunlaştırma süreçlerinden geçmektedir. Bu süreçte, proteoliz, lipoliz, kalıntı aminoasit ve yağ asitlerinin katabolizması, laktoz ve sitrat metabolizması gibi birden çok metabolik yolla oluşan bileşikler peynire özgü tat-koku bileşiklerinin oluşumunu sağlamakta ve tekstür özelliklerini geliştirmektedir [134].

Proteolizin, bu yolların içinde en karmaşık olan metabolik yol olduğu düşünülmektedir. Peynirin olgunlaşma sürecinde meydana gelen proteolizin, koagülant (kimoziin, pepsin gibi), sütte bulunan endojen enzimler (plazmin, katepsin D ve belki diğer somatik hücre proteinazları), starter ve starter dışı mikroorganizmalar, ve olgunlaşmayı hızlandırmak için kullanılan ekzojen proteinaz ve/veya peptidaz kaynaklı enzimler gibi birden fazla kaynağı olabilmektedir [135]. Proteoliz, peynirin olgunlaşma sürecine en az dört farklı yoldan katkı sağlamaktadır. Bunlar; aminoasit ve peptitlerin ya da aminoasit ve aminlerin katabolizması sonucu oluşan bileşiklerin doğrudan tat üzerine etkileri, çiğneme sırasında ortaya çıkan fazla miktardaki hoş tat-aroma bileşiklerinin salınımını kolaylaştırması, amonyak oluşumu nedeni ile pH'da meydana gelen değişiklikler ve protein ağının kırılması ile tekstür ve su tutma kapasitesindeki değişiklikler olarak sıralanabilir [134].

Sütün sol halden jel haline dönüşmesinde temel etken olan kimoziin, olgunlaşma sürecinde de peynir yapı ve aromasına büyük katkı sağlamaktadır. Süte eklenen rennet enziminin büyük kısmının peynir altı suyunun drenajı ile pıhtıdan ayrıldığı bilinmekle birlikte, pıhtıda kalan kimoziin miktarının peynir çeşidine göre % 15-50 arasında değiştiği bildirilmiştir [122,136]. Peynir pıhtısında kalan rennet miktarı ve aktivitesi birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, rennet ilavesi ve peynir altı suyu salınımı sırasındaki pH değeri azaldıkça, pıhtıda kalan kimoziin aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, sütün kazein içeriği, eklenen rennetin nitelik ve niceliği ile peynir pıhtısına uygulanan haşlama gibi işlemlerin de peynirde kalıntı kimoziin aktivitesine önemli derecede etki ettiği bildirilmiştir [133, 137]. Peynir pıhtısında kalan rennet, pH 4.6 çözünür azot ve suda çözünür azot miktarına katkı sağlayan proteolitik ajanların başında gelmektedir [3, 122, 136]. Bunların yanı sıra, rennetin proteoliz sonrası açığa

ıkan kısa zincirli ve hidrofobik peptitlerle ya da bunların proteinaz ya da peptidazlarla katabolizması sonucu aıĝa çıkan aminoasitler ve kısa zincirli peptitler ile peynir aromasına doĝrudan ya da dolaylı olarak yol atıĝı da belirtilmektedir [134, 136].

Plazmin, rennet ile birlikte, peynirin olgunlaşma aşamasında kazeinlerin birincil proteolizinden sorumlu enzim olarak nitelendirilmektedir. Rennet α_{s1} -kazeini daha çok hidrolize ederken, plazmin peynir pıhtısındaki β -kazein ve α_{s2} -kazeini öncelikli olarak proteolize uĝratmaktadır. Plazminin zellikle Cheddar ve Swiss-type (İsveç tipi) gibi bazı peynir eşitleri için olgunlaşma sürecinde oldukça kritik önemde katkısı olduĝu belirtilmiştir [138]. Plazminin bu katkısı peynirde aroma oluşumu için arzu edilse de, özellikle geç laktasyon sütlerinden elde edilen peynirlerin, yüksek plazmin aktivitesi nedeni ile, düşük kaliteye sahip olduĝu da belirtilmiştir. Ayrıca, yüksek düzeydeki plazmin aktivitesinin, olgunlaşma sürecinde aşırı proteolize yol açarak peynirde aci tat etmeni hidrofobik peptitlerin oluşumunu hızlandırdıĝı da belirtilmiştir. Yine de, son zamanlarda gündemde olan peynirin olgunlaştırma sürecinin hızlandırılması ve taze peynirlerde aroma geliştirilmesi amaçları ile yapılan çalışmalarda plazmin enziminden faydalanılabileceĝi tartışılmaktadır [113].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Plazmin (EC 3.4.21.7) ve kimoziin (EC 3.4.23.4) enzimleri Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Lous, MO, USA)'den temin edilmiştir. Ayrıca, kullanılan fenolik bileşik standartları (Kateşin (C), epikateşin gallat (ECG), epigallokateşin-3-gallat (EGCG), kuersetin (QUER),myrisetin (MYR), resveratrol (RESV), kurkumin (CURC), ferulik asit (FA), p-kumarik asit (CA), gallik asit (GA)) da yine Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Lous, MO, USA)'dan temin edilmiştir. Plazmin substratı (N-succinyl-ala-phe-lys 7-amido-4-methylcoumarin) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St.Lous, MO, USA)'dan; kimoziin substratları (H-Pro-Thr-Glu-Phe-p-nitro-Phe-Arg-Leu-OH ve H-Leu-Ser-p-nitro-Phe-Nle-Ala-Leu-OMe trifluoroacetate salt) ise BACHEM California Inc (Torrance, USA)'den temin edilmiştir. Peynir üretiminde kullanılan çiğ süt Tarım Kredi Birlik Tarım Ürünleri A.Ş.'den temin edilmiştir. Peynir üretiminde kullanılacak Maxiren (kimoziin) enzimi ise Bahçivan Gıda A.Ş. tarafından sağlanmıştır. Peynir üretiminde kullanılan yeşil çay ekstraktı (YÇE), DSM Nutritional Products Ltd (Basel, Switzerland) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Plazmin Aktivitesi Ölçümleri

Plazmin enziminin aktivitesi Richardson ve Pearce [139]'e göre, fluorometrik olarak belirlenmiştir. N-succinyl-ala-phe-lys 7-amido-4-methylcoumarin, plazmine özgü fluorojenik substrat olarak kullanılmıştır. Ölçümler Cary eclipse fluoresans spektrofotometre (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)) ile, quartz mikroküvet kullanılarak alınmıştır. Uyarılma ve emisyon dalga boyları λ_{ex} : 380 nm, λ_{em} : 460 nm, slit genişliği 5 nm olarak belirlenmiştir. 85 μ L 0.05mM tris-glisin tamponu (pH 7.5), 20 μ L stok substrat (1.23 mM), ve 15 μ L 0.3 μ M Tris-glisin tamponunda çözülmüş plazmin çözeltilerinden oluşan reaksiyon karışımı mikro küvette hazırlanarak, fluoresans şiddetindeki artış 10 dk boyunca her 30 saniyede ölçüm alınarak kaydedilmiş ve reaksiyon hızından yola çıkarak enzim aktivitesi değerleri (a.b./dk) belirlenmiştir.

3.2.2. Plazmin İnhibisyon Denemeleri

Denemelerde kullanılacak tüm standart stok fenolik çözeltileri uygun organik çözücülerde çözülmüş ve sonraki seyreltmeler Tris-glisin tamponu (pH 7.5) kullanılarak yapılmıştır. Fenolik bileşikler (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RES, CURC, FA, CA, GA) ve plazmin çözeltisi son konsantrasyonları sıra ile 300 μ M ve 2.4 μ M olacak şekilde 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüm örnekler 10°C’de denge sıcaklığına getirilmiş ve sabit sıcaklıkta plazmin aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm fenolik bileşikler için, fenolik çözeltisindeki organik çözücü ile aynı derişime sahip organik çözücü içeren ve fenolik bileşik içermeyen kontrol örnekleri de hazırlanmıştır. Tampon çözeltideki plazmin ve fenolik bileşik sistemlerinin yanı sıra, ortamda süt proteinlerinin varlığının, fenolik bileşiklerin plazmine karşı olası inhibitör özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacı ile plazmin aktivitesi ölçümleri süt matrisinde de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 300 μ M ve 2.4 μ M son derişime sahip fenolik bileşikler ve plazmin, rekonstitüe süte ilave edilerek 37°C’de 15 dk inkübe edilmiş ve ardından plazmin aktivitesi ölçümleri daha önce belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Enzim Kinetiğinin İncelenmesi ve IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Plazmine karşı inhibitör özellik gösteren fenolik bileşikler için enzim kinetiği çalışmaları dahilinde, sergiledikleri inhibisyonun tipini belirlemek amacı ile Lineweaver–Burk grafiklerinden yararlanılmıştır. Fenolik bileşikler (300 μ M) ile önceden inkübe edilmiş plazmin enzimi (2.4 μ M), değişken derişimdeki substrat (0.098, 0.197, 0.295, ve 0.394 mM) ile etkileştirilmiş ve reaksiyon hızı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değeri, Michaelis–Menten garfiğine non-lineer regresyon uygulanarak belirlenmiştir. 0.21mM substrat derişimindeki IC₅₀ değerleri, değişken fenolik (inhibitör) derişimlerine karşı plazmin inhibisyon oranı (%) çizilerek oluşturulan grafiklere non-lineer regresyon uygulanarak elde edilmiştir.

3.2.2.2. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile Plazmin Konformasyonunun Belirlenmesi

Plazminin ikincil yapısını belirlemek amacı ile CD ölçümleri, Jasco J815 CD spektrofotometre (Tokyo, Japonya) kullanılarak yürütülmüştür. Bu amaçla 1mm genişliğe sahip küvet kullanılmış ve tüm ölçümler 25°C’de alınmıştır. 192-250 nm arasındaki far-UV spektrumu alınan 3 ölçümün ortalaması olarak kaydedilmiştir.

Enstrümantal parametreler şu şekildedir; 50 nm/dk tarama hızı, 1 nm bant genişliği, 100 mdeg sensitivite, ve 4 s cevap verme süresi. Plazmin ve tüm fenolik bileşikler 10mM fosfat tamponunda (pH 6.8), son derişimleri 1 μ M ve 50 μ M olacak şekilde 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örneklerdeki en yüksek organik bileşik oranının %10’ dan daha az olduğu ve bu oranın plazminin ikincil yapısında herhangi bir değişime yol açmadığı yapılan çalışmalarla öncelikli olarak belirlenmiştir. Bazı fenolik bileşiklerin girişim yapması nedeni ile, fenolik bileşiklerin 10mM fosfat tamponundaki (pH 6.8) spektrumu, plazmin-fenolik kompleksi spektrumundan çıkarılarak data analizi yapılacak spektrumlar elde edilmiştir. Sonuçlar ortalama rezidü molar eliptiste ($[\Theta]R$, $\text{degcm}^2 \text{dmol}^{-1}$) olarak verilmiştir. Fenolik bileşikler ile etkileştirilmiş plazmin örneklerine ait sekonder yapı tahminleri CDPPro yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen datalar CDPPro yazılımı içinde 43 standart proteini oluşturan referans set baz alınarak CONTILL programı ile işlenmiştir.

3.2.2.3. Plazmin-fenolik Etkileşimlerine Ait Termodinamik Parametrelerin İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (İTK) ile Belirlenmesi

Plazmin ve plazmine karşı inhibisyon gösteren fenolik bileşiklerin (ECG, EGCG, QUER, MYR, CURC) bağlanma karakteristiklerinin belirlenmesi amacı ile plazminin bu fenolik bileşikler ile titrasyonu Microcal 200 enstrümanı (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, referans hücresi saf su ile doldurulmuş; reaksiyon hücresi ise seyrelme ısı ölçümü için 10mM fosfat tamponu (pH 7.5), örnek titrasyonları için 10mM fosfat tamponu (pH 7.5)’nda çözünmüş plazmin enzimi ile doldurulmuştur. Analizde, 300 μ L fosfat tamponu ya da plazmin enzimi (2 μ M), her bir polifenol ile (50 μ M) 30°C’de titre edilmiştir. Fenolik bileşikler ile plazmin arasındaki etkileşimler sonucu açığa çıkan ısı, her bir fenolik için seyrelme ısıları ile ilgili düzeltmelerin yapılmasının ardından belirlenmiştir. Zamana karşı ısı akışını ($\mu\text{cal s}^{-1}$) gösteren grafikler Orijin 7 yazılımı kullanılarak integre edilmiş ve fenolik/plazmin oranına karşı mol başına entalpi değişimini gösteren grafikler elde edilmiştir. Bağlanmaya ait termodinamik parametreler (bağlanma bölgesi sayısı(n), bağlanma sabiti (K), bağlanma entalpisi (ΔH), serbest enerji (ΔG) ve entropi (ΔS)) de datanın uygun bağlanma modeli ile fit edilmesinin ardından belirlenmiştir.

3.2.3. Yeşil Çay Ekstraktının Sütün Plazmin ile Pıhtılaşmasına Etkisinin Belirlenmesi

Saflaştırılmış fenolik bileşikler ile yapılan inhibisyon denemeleri sonucunda yeşil çay ekstraktı (YÇE), tez kapsamında fenolikçe zengin peynir üretimi amacı ile kullanılacak kullanılacak doğal fenolik kaynağı olarak belirlenmiştir. YÇE'nin sütte plazmin üzerine etkisini belirlemek amacı ile süt örnekleri ile koagülasyon denemeleri yürütülmüştür. 25 mL süt örneğine son derişimi 1000 ppm olacak şekilde YÇE ve son derişimi 0.3µM olacak şekilde plazmin ilave edilmiştir. Pozitif kontrol örneği ise sadece plazmin enzimi (0.3µM) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Plazmin ilavesi olmadan, 1000 ppm YÇE ilavesi ile hazırlanan süt örneği de negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin hazırlanmasının ardından, her bir örnekten 5mL alikuotlar hazırlanmış ve 5 gün boyunca alınan örnekler 20 000 x g' de 10 dk boyunca santrifüj edilerek elde edilen pıhtı hacmi üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

3.2.4. Kimozin Aktivitesi Ölçümleri

Kimozin aktivitesi Martin ve ark. [140]'a göre, H-Leu-Ser-p-nitro-Phe-Nle-Ala-Leu-OMe trifluoroacetate substratı kullanılarak, Thermo Scientific GENESYS 10S Series UV spektrofotometre ile belirlenmiştir. UV spektrofotometrik ölçümler, heptapeptidin kimozin tarafından proteolize uğraması sonucunda oluşan tripeptit ve heptapeptidin belli dalga boyunda verdiği absorbansın değişmesi ve bu değişimin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Kimozin aktivitesi ölçümlerinde öncelikli olarak, heptapeptit ve proteoliz ürünü tripeptidin maksimum absorbans farkının gözlemlendiği dalga boyunun belirlenmesi amacı ile substrat ve kimozin ile inkübe edilmiş substrat içerikleri 230-400 nm aralığında scan edilmiştir. Kimozin substratı ve kimozin ile hidroliz sonucu oluşan tripeptit arasındaki maksimum absorbans farkının 310 nm'de ölçüldüğü belirlenmiştir. Ardından, kimozin aktivitesi değerleri, 310 nm'de 10 dakika boyunca 60 saniyede bir alınan ölçümler sonucu elde edilen grafiğe ait ilk hız değerleri kullanılarak belirlenmiş ve enzim aktivitesi Abs*1000/dk olarak ifade edilmiştir. Kimozin, 50 mM fosfat tamponunda (pH 6.0), substrat ise 10 mM asetat tamponunda (pH 4.7) çözünerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamında, ölçüm öncesi kimozin ve substratın son derişimleri sırası ile 100 nM ve 98 µM'dır. Denemeler 2 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.5. Kimozin İnhibisyon Denemeleri

Fenolik bileşiklerin kimoziin aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla; öncelikle kimoziin ve fenolik bileşikler son derişimleri 5µM ve 500µM olacak şekilde 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortam sıcaklığında dengeye bırakılan kimoziin-fenolik kompleksleri ile daha önce belirtildiği şekilde kimoziin aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile Kimozin Konformasyonun Belirlenmesi

Kimoziinin ikincil yapısını belirlemek amacı ile CD ölçümleri Jasco J815 CD spektrofotometre (Tokyo, Japonya) kullanılarak alınmıştır. Bu amaçla 1mm genişliğe sahip küvet kullanılmış ve tüm ölçümler 25°C’de alınmıştır. 192-250 nm arasındaki far-UV spektrumu alınan 3 ölçümün ortalaması olarak kaydedilmiştir. Enstrümantal parametreler şu şekildedir; 50 nm/dk tarama hızı, 1 nm bant genişliği, 100 mdeg sensitivite, ve 4 s cevap verme süresi. Kimozin ve tüm fenolik bileşikler 50mM fosfat tamponunda (pH 6.8), son derişimleri 2 µM ve 50 µM olacak şekilde 37°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. Bazı fenolik bileşiklerin girişim yapması nedeni ile, fenolik bileşiklerin 50mM fosfat tamponundaki (pH 6.8) spektrumu, kimoziin-fenolik kompleksi spektrumundan çıkarılarak data analizi yapılacak spektrumlar elde edilmiştir. Ayrıca fenolik bileşiklerin tam olarak çözünebilmesi için gerekli organik çözücü içerikleri kimoziinin yapısında bazı değişikliklere yol açtığından, sonuçlar her bir fenolik için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama rezidü molar eliptiste ($[\Theta]R$, degcm² dmol⁻¹) olarak verilmiştir. Sekonder yapı tahminleri CDPro yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen datalar CDPro yazılımı içindeki CONTILL programı ile işlenmiştir.

3.2.5.2. Kimozin-fenolik Etkileşimlerine Ait Termodinamik Parametrelerin İzotermal Titrasyon Kalorimetresi (İTK) ile Belirlenmesi

Kimoziin ile fenolik bileşikler arasındaki olası etkileşimlerin belirlenmesi amacı ile, kimoziinin fenolik bileşikler ile titrasyonu Microcal 200 enstrümanı (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, referans hücresi destile su ile doldurulmuş; reaksiyon hücresi ise seyrelme ısısı ölçümü için 50mM fosfat tamponu (pH 6.8), örnek titrasyonları için 10mM fosfat tamponu (pH 7.5)’nda çözülmüş kimoziin enzimi ile doldurulmuştur. Analizde, 300 µL fosfat tamponu ya da kimoziin enzimi (10 µM), her bir polifenol ile (100 µM) 30°C’de titre edilmiştir. Fenolik bileşikler

ile kimozin arasındaki etkileşimler sonucu açığa çıkan ısı, her bir fenolik için seyrelme ısıları ile ilgili düzeltmelerin yapılmasının ardından belirlenmiştir.

3.2.6. CMP (Kazeinomakropeptit) Analizi

Tez çalışmasının sonraki aşamasında minyatür peynir yapımında kullanılmak üzere fenolik kaynağı olarak seçilen yeşil çay ekstraktının, sütün enzimatik koagülasyon sürecine etkisinin belirlenmesi amacı ile CMP analizi RP-HPLC ile yürütülmüştür [141]. Bu amaçla, YÇE ilave edilen (1000ppm ve 2000ppm) ve edilmeyen süt örneklerinde rennetlenme süreci boyunca alınan örneklerde CMP oluşumu değerlendirilmiştir. Süt örnekleri analiz öncesinde pastörize edilmiştir (65°C/30dk). Yapılan analizlerde enzimatik sürecin göstergesi olarak oluşan CMP'nin iki genetik varyantı (CMP-A ve CMP-B) RP-HPLC ile belirlenmiştir. Tüm örneklerdeki CMP (%) içeriği (CMP-A + CMP-B), YÇE içermeyen kontrol örneklerindeki maksimum pik alanı referans alınarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli (ζ) Ölçümü

YÇE ilavesinin sütün rennet ile koagülasyonu sırasında kazein misellerinin agregasyon mekanizmasına etkisini belirlemek amacı ile partikül boyutu ve zeta potansiyeli Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) ile belirlenmiştir. Bu amaçla, pastörize edilen (65°C/30dk) süt örnekleri yağından ayrılmış, ve 25°C'ye ayarlanan su banyosunda dengeye gelmesi sağlanmıştır. 1000 ppm YÇE ilavesi yapılan ve yapılmayan (kontrol) 5 mL süt örneklerine 20 µL kimozin (1/100, v/v) ilave edilmiştir. Tüplerden kimozin ilavesinden önce ve kimozin ilavesinden 10, 20, 30, 45 ve 60 dk sonra alınan örnekler 1:20 oranında süt ultrafiltratını simüle eden tampon ile (Tris base 0.02 M, NaCl 0.05 M, CaCl₂ 0.003 M, pH: 6.7) seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler ölçüm öncesinde 0.45 µm naylon filtreden geçirilmiştir. ζ ve partikül boyutu DLS ile alınan ölçümler sonucu belirlenmiştir. Ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Analiz iki tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.8. Minyatür Peynir Üretimi

3.2.8.1. Peynire İşlenecek Süte Uygulanan Kimyasal Analizler

Peynir sütünde kuru madde analizleri gravimetrik olarak [142], yağ analizi Gerber metodu ile [143], protein içeriği ise spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [144]. Peynir sütlerinin pH'sı masa tipi dijital pHmetre (Sartorius, TE214S, Germany) ile ölçülmüştür.

3.2.8.2. Minyatür Peynir Üretim Basamakları

Laboratuvar ölçekli peynir üretimi için aşağıda belirtilen akış şeması izlenmiştir:

- ♣ Çiğ süt
- ♣ Pastörizasyon (65°C/30 dk)
- ♣ Soğutma (32°C)
- ♣ Plazmin ilavesi
- ♣ CaCl₂ ilavesi
- ♣ Starter kültür ilavesi (*Lactococcus lactis* ssp *lactis* & *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*)
- ♣ Ön olgunlaştırma
- ♣ Yeşil çay ekstraktı içeren peynir örnekleri için YÇE ilavesi
- ♣ Rennet (Maxiren) ilavesi
- ♣ Koagülasyon süreci (36°C/1saat)
- ♣ Pıhtı kesimi
- ♣ Peynir altı suyu uzaklaştırma (3000xg, 1 saat, 20°C)
- ♣ Salamurada bekletme (%14 NaCl, 15 dk)
- ♣ Salamura uzaklaştırma (4000xg, 2 dk, 20°C)
- ♣ Vakum paketlenme
- ♣ Depolama (+4°C)

Yapılan ön denemelerde, olgunlaşma süresince peynir örneklerinde plazmin aktivitesi saptanamaması nedeni ile, plazmin peynir üretiminde dışarıdan ilave edilmiştir. YÇE içeren örneklerdeki YÇE derişimi, peynire işlenecek sütte 1000ppm olacak şekilde ayarlanmıştır. Olgunlaşmanın Olgunlaşmanın 1., 15., 30. ve 60. günlerinde alınan örnekler ile sonraki analizler iki tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.2.9. Olgunlaşma Sürecinde Peynir Analizleri

3.2.9.1. Plazmin Aktivitesi Ölçümleri

Olgunlaşma sürecinde alınan örneklerde plazmin aktivitesi ölçümleri Richardson ve Pearce [139]'a göre yürütülmüştür. Bu amaçla, belirtilen metoda ek olarak, örnek hazırlama aşamasında ϵ -aminokaproik asit (EACA) ilave edilerek plazminin kazein misellerinden ayrılarak seruma geçmesi sağlanmıştır. Fluorometrik ölçümler N-succinyl-ala-phe-lys-7-amido-4-methylcoumarin kullanılarak gerçekleştirilmiş ve fluoresans intensitesindeki değişim 30 dk boyunca dakikada bir alınan ölçümler ile kaydedilerek plazmin aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlar $\text{nmol AMC} \cdot \text{dk}^{-1} \cdot \text{g}$ kuru örnek⁻¹ olarak verilmiştir.

3.2.9.2. Kalıntı Kimozin Aktivitesi Ölçümleri

Peynir örneklerinde kalıntı kimozin analizleri Hurley ve ark [145]'a göre gerçekleştirilmiştir. Peynir örnekleri trisodyum sitrat tamponunda (pH 7) homojenize edildikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından 2000xg'de 5°C'de 5 dk santrifüj edilen örneklerden alınan sıvı faz, sodyum format tamponu (pH 3.2) ve stok kimozin substratı (Pro-Thr-Glu-Phe-p-nitro-Phe-Arg-Leu-OH) ile 37°C'de 2.5 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak amacı ile örnekler 70°C'de 10 dk bekletilmiş ve ardından 16000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant 0.45 μ M RC filtreden geçirilerek RP-HPLC ile analiz edilmiştir. RP-HPLC analizleri Agilent 1100 seri HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım, Zorbax C18 (250x4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 25°C ve okumanın yapıldığı dalga boyu 300 nm'dir. Mobil faz A olarak, %0,1 TFA (Trifluoroasetik asit, h/h) içeren deiyonize su ve Mobil faz B olarak, %0,1 TFA içeren asetonitril (h/h) kullanılmıştır. Kullanılan gradient program Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

3.2.9.3. Kuru madde Tayini

Peynir örneklerinde toplam kurumadde miktarı gravimetrik olarak 103°C'de yapılmıştır [146].

Çizelge 3. 1. RP-HPLC ile kalıntı kimozi analizinde kullanılan gradient program

Süre	% Mobil faz B	Akış hızı (mL/dk)
0	15	1
5	15	1
25	45	1
28	95	1
30	95	1
35	15	1

3.2.9.4. Protein Tayini

Toplam azotlu maddeler tayini AOAC metoduna göre Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Hesaplanan % toplam azotlu madde değerleri 6,38 faktörü ile çarpılarak % protein içerikleri hesaplanmıştır [147].

3.2.9.5. pH 4.6'da Çözünür Azotlu Madde Miktarının Belirlenmesi

pH 4,6'da çözünür ve çözünmeyen fraksiyon Kuchroo ve Fox [148]'a göre hazırlanmıştır. Bu amaçla; homojenize edilmiş peynir örneklerinden 5 g tartılmış ve üzerlerine 25 mL deiyonize su eklenmiştir. HCl ve NaOH kullanılarak pH 4,6'ya ayarlanmıştır ve 40°C'de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C'de ve 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve Whatman No:113 filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Elde edilen filtratta Kjeldahl yöntemi ile daha önce belirtilen şekilde azotlu madde tayini yapılmıştır. pH 4.6 çözünür azot miktarı, örneklerdeki toplam azotlu maddeler içindeki % ifade olarak belirtilmiştir.

3.2.9.6. Üre-PAGE Analizi

Olgunlaşma sürecinde gerçekleşen proteoliz düzeyinin elektroforetik olarak belirlenmesi amacı ile üre-PAGE analizleri yürütülmüştür. Bu amaçla, önceden liyofilize edilerek kurutulan pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyon örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada Mini Protean® BioRad Medium vertical electrophoresis ünitesi kullanılmıştır (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK). Jeller 20 mA sabit akımda yürütülmüş ve bir gece boya çözeltilisinde bekletilerek proteinlerin boyanması sağlanmıştır. Çalışmada elde edilen jeller Epson perfection 4180 scanner (Epson Perfection 4180 photo, SEIKO EPSON Corp. Nagano, Japan) kullanılarak taranmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.9.7. RP-HPLC ile Peptit Profilinin Belirlenmesi

Minyatür peynir örneklerinde, olgunlaşma süresince peptit profilinin belirlenmesi amacı ile RP-HPLC analizleri yürütülmüştür. Bu amaçla, daha önceden elde edilen pH 4.6'da çözünür fraksiyonlar %0.1 TFA içeren deiyonize su ile 1:1 oranında seyreltilmiş ve analizlerde kullanılmıştır. RP-HPLC analizleri Agilent 1100 seri HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım, ACE C18 (250x4,6 mm, 5µm, 300 Å) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C ve okumanın yapıldığı dalga boyu 214 nm'dir. Mobil faz A olarak, %0,1 TFA (Trifluoroasetik asit, h/h) içeren deiyonize su ve Mobil faz B olarak, %0,1 TFA içeren asetonitril (h/h) kullanılmıştır. Kullanılan gradient program Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 17.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü $p < 0.05$ önem düzeyine göre, ANOVA ve Tukey testi kullanılarak belirlenmiştir.

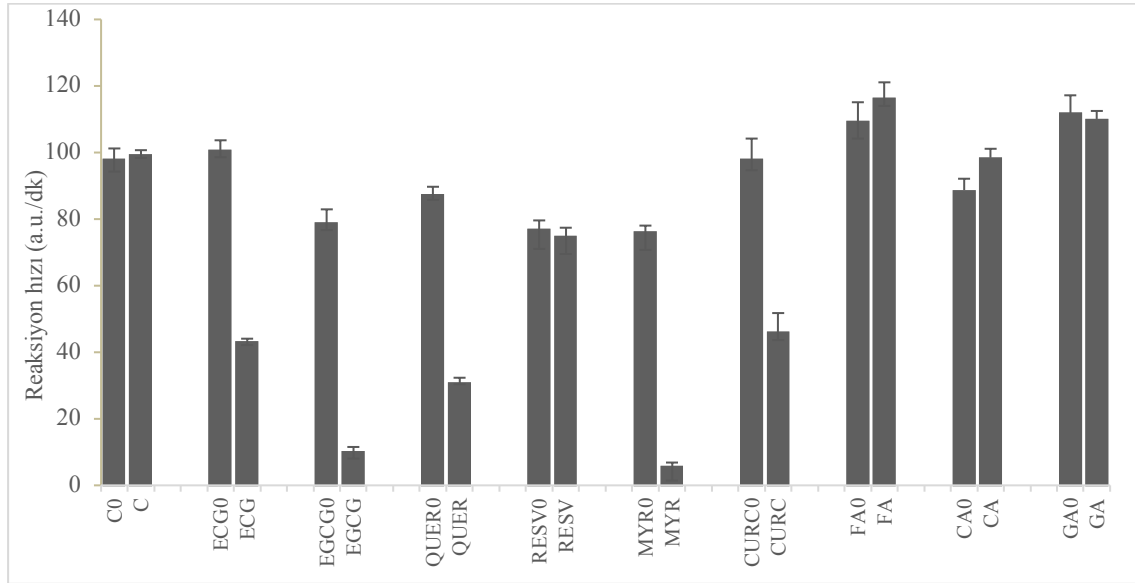
Çizelge 3. 2. Peptit profilinin belirlenmesinde kullanılan RP-HPLC gradient programı

Süre	% Mobil faz B	Akış hızı (mL/dk)
0	0	1
10	0	1
90	50	1
95	40	1
100	40	1
105	5	1
110	0	1

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Fenolik Bileşiklerin Plazmin Aktivitesi Üzerine Etkisi

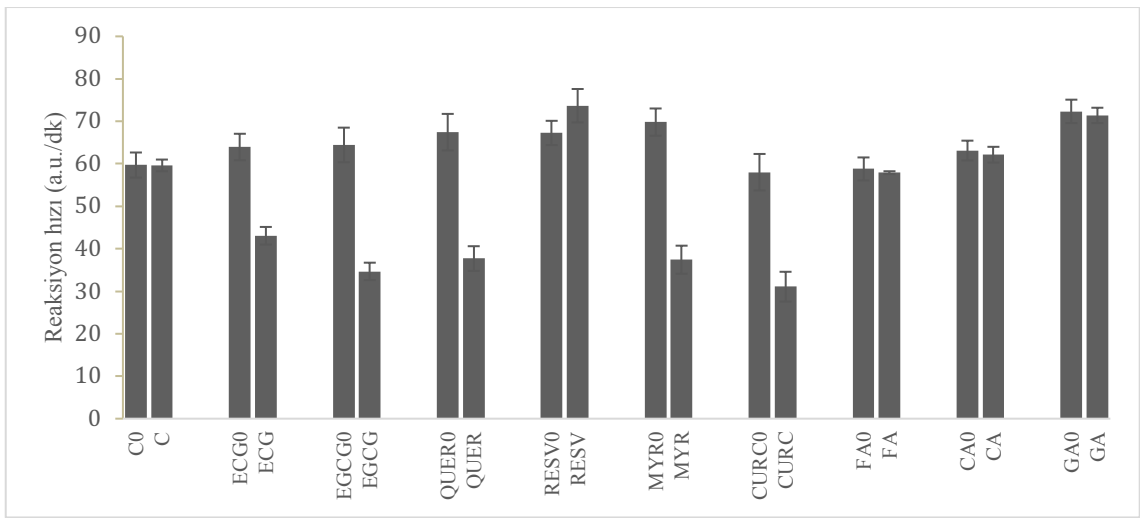
Mevcut tez çalışması kapsamında kullanılan 10 adet fenolik bileşik standardının (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CUR, FA, CA, GA) plazmine karşı inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan analizlerde, fenolik bileşikler ile inkübe edilen örnekler ve kontrol örneğine ait plazmin aktivitesi değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Fenolik asitlerin (FA, GA, CA) plazmin enzimine karşı inhibe edici etkisi gözlenmezken ($p>0.05$), ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC’in %60, 86, 65, 90, 52 düzeyinde plazmin inhibisyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Analiz edilen flavonoidlerden kateşinin (C) ise fenolik asitlere benzer şekilde plazmin aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür.



Şekil 4. 1. Model sistemlerde plazminin 300 μ M fenolik ile etkileştirildikten sonraki (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CURC, FA, CA, GA) ve kontrol örneklere (C0, ECG0, EGCG0, QUER0, MYR0, RESV0, CURC0, FA0, GA0, CA0) ait reaksiyon hızları.

Xue ve ark [149], plazmin gibi bir serin proteaz olan uPA enzimine karşı kuersetinin inhibisyon özelliği gösterdiğini belirtmişler ve flavonoidlerde bulunan kateşol grubunun inhibisyonda önemli role sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca, serin proteazların inhibisyonunda, 4. karbon pozisyonundaki karbonil grubunun önemli rol oynadığı belirtilmiştir [150]. Mevcut çalışmada da MYR ve QUER’in inhibitör özellik

göstermesinde bahsedilen grubun etkisi olabileceği düşünülmektedir. Ancak, 4. pozisyonda karbonil grubu içermemesine rağmen, ECG ve EGCG da plazmin aktivitesinde azalmaya yol açmıştır. Bu durum kateşin türevlerinde bulunan galloyl grubu ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde galloyl grubunun, fenolik bileşiklerin proteinlere bağlanma afinitesini artırdığı ve enzim inhibisyonuna yol açtığına dair veriler mevcuttur [103]. Galloyl grubu içermese de bazı araştırmalar kateşinin (C), bazı serin proteazlara karşı inhibitör özellik gösterdiğini tartışsa da [151], bu çalışmada kateşinin plazmin aktivitesinde değişime yol açmadığı gözlenmiştir.



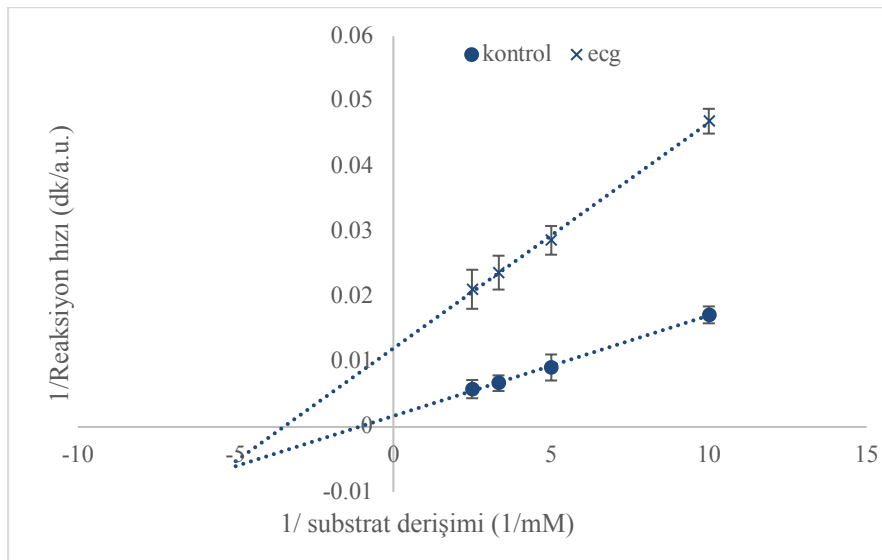
Şekil 4. 2. Süt matrisinde, plazminin 300µM fenolik ile etkileştirildikten sonraki (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CURC, FA, CA, GA) ve kontrol örneklerle (C0, ECG0, EGCG0, QUER0, MYR0, RESV0, CURC0, FA0, GA0, CA0) ait reaksiyon hızları.

Fenolik bileşiklerin süt proteinleri (özellikle kazeinler) ile de oldukça yüksek düzeyde etkileşime girdiği bilindiğinden, fenolik bileşiklerin plazmine karşı olası inhibisyon özelliklerinin süt ortamında değişebileceği öngörülmüş ve bu amaçla plazmin inhibisyonu denemeleri süt proteinleri varlığında da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre (Şekil 4.2), plazmin inhibisyonuna yol açan fenolik bileşiklerin, süt proteinleri varlığında da inhibitör özelliklerini koruduğu belirlenmiştir. Ancak, inhibisyon değerleri ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC için %35, 47, 44, 46 ve 40 düzeyine inmiştir. Kazeinlerin yüksek düzeydeki prolin içerikleri nedeni ile fenolik bileşikler ile etkileşime girerek bu sonucu doğrulduğu kanısına varılmıştır. Benzer şekilde Naz ve ark. [104] da, α -amilaz, kimotripsin, tripsin ve laktaza karşı inhibitör özellik

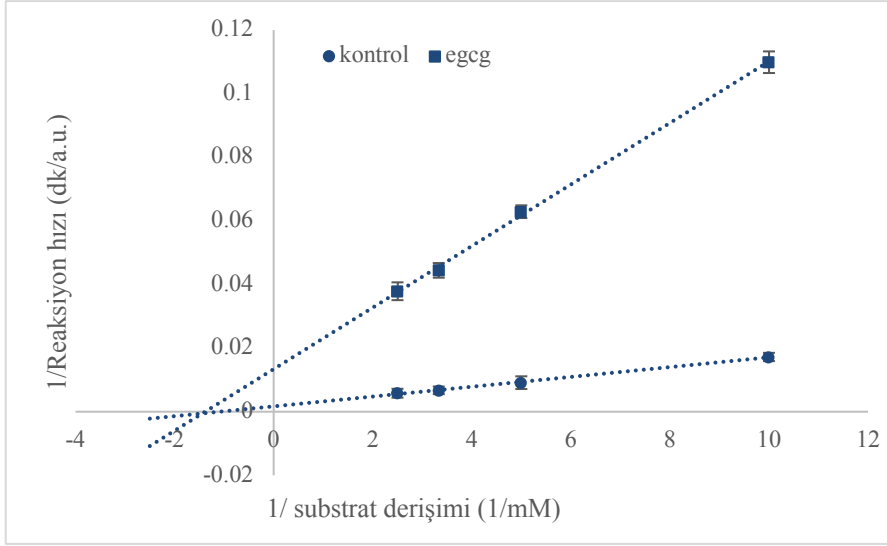
gösteren EGCG'nin inhibisyon etkisinin, prolince zengin tükürük proteinlerinin varlığında azaldığını rapor etmişlerdir. Model sistemlerde inhibisyona yol açmayan fenolik asitler ve kateşinin, süt matrisinde de plazmin aktivitesinde değişime yol açmadığı belirlenmiştir.

4.2. Plazmin İnhibisyonunun Kinetik Değerlendirmesi

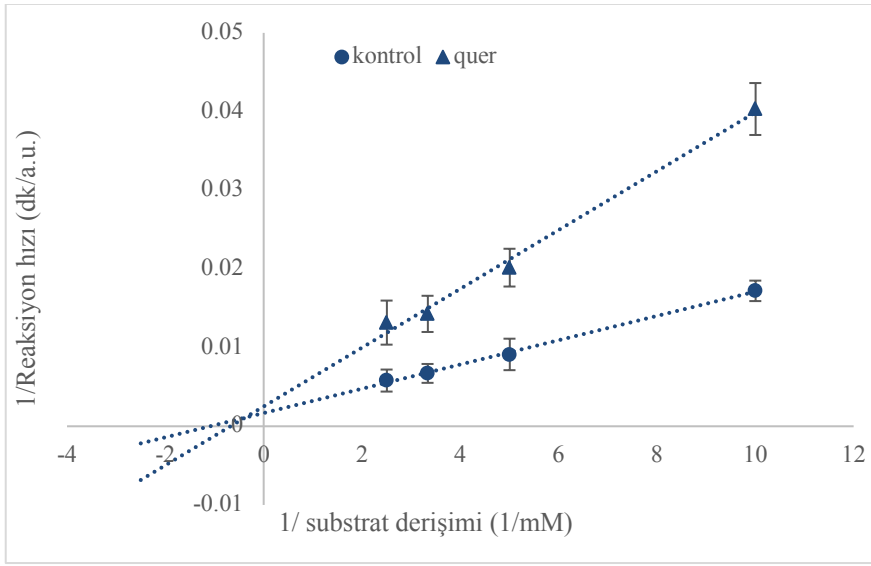
Tez çalışmasının ilk aşamasında model sistemlerde ve süt matrisinde plazmine karşı inhibitör özellik gösteren fenolik bileşikler, ileri kinetik değerlendirmeye tabi tutulmuştur. İnhibisyon tipleri, Lineweaver–Burk grafiklerinden faydalanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.3-7). Ayrıca, inhibisyona ait V_{\max}^{app} (a.u/dk) ve K_m^{app} değerleri de Michaelis-Menten grafiklerine uygulanan non-lineer regresyon sonucu hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).



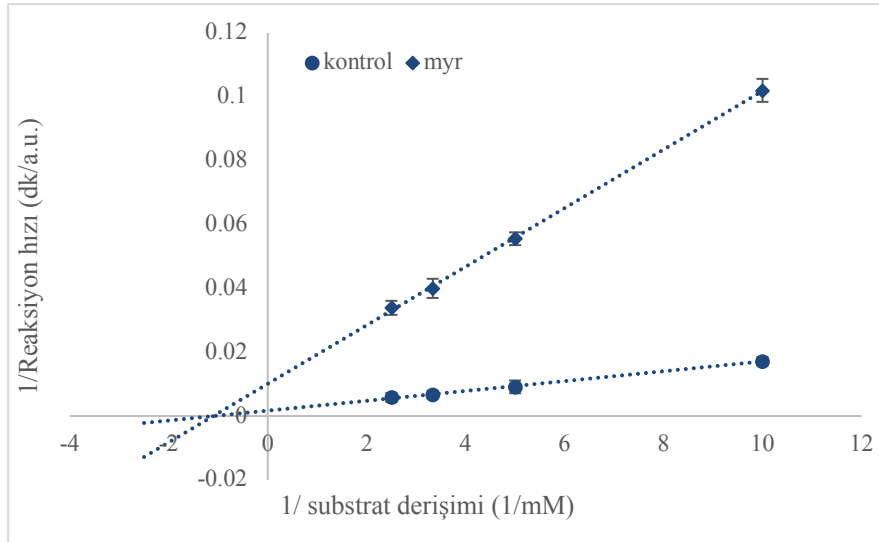
Şekil 4. 3. 300µM epikateşin gallat (EGC) varlığında plazmin enzimine (2.4µM) ait Lineweaver–Burk grafiği



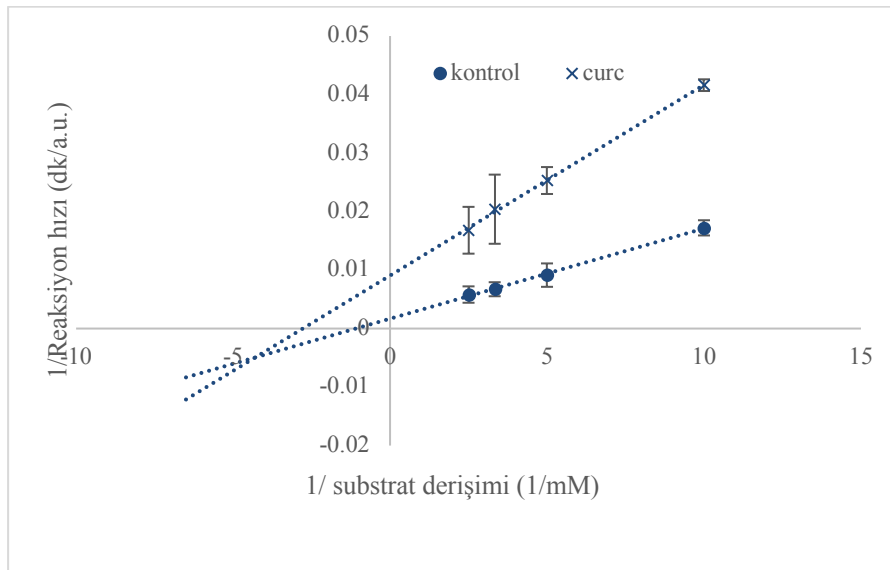
Şekil 4. 4. 300 μ M epigallokateşin gallat (EGCG) varlığında plazmin enzimine (2.4 μ M) ait Lineweaver–Burk grafiği



Şekil 4. 5. 300 μ M kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4 μ M) ait Lineweaver–Burk grafiği



Şekil 4. 6. 300 μ M kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4 μ M) ait Lineweaver–Burk grafiği



Şekil 4. 7. 300 μ M kuersetin (QUER) varlığında plazmin enzimine (2.4 μ M) ait Lineweaver–Burk grafiği

İstatistiksel olarak benzer K_m^{app} değerleri ile azalan V_{max}^{app} değerleri, EGCG, QUER ve MYR'in yarışmasız tip inhibisyon sergilediklerini, buna karşın K_m^{app} ve V_{max}^{app} değerlerinin her ikisinde gözlenen azalmanın ise ECG ve CURC'in karışık tip inhibisyona yol açtıklarını göstermiştir. ECG ve CURC için bulunan karışık tip inhibisyon, bu

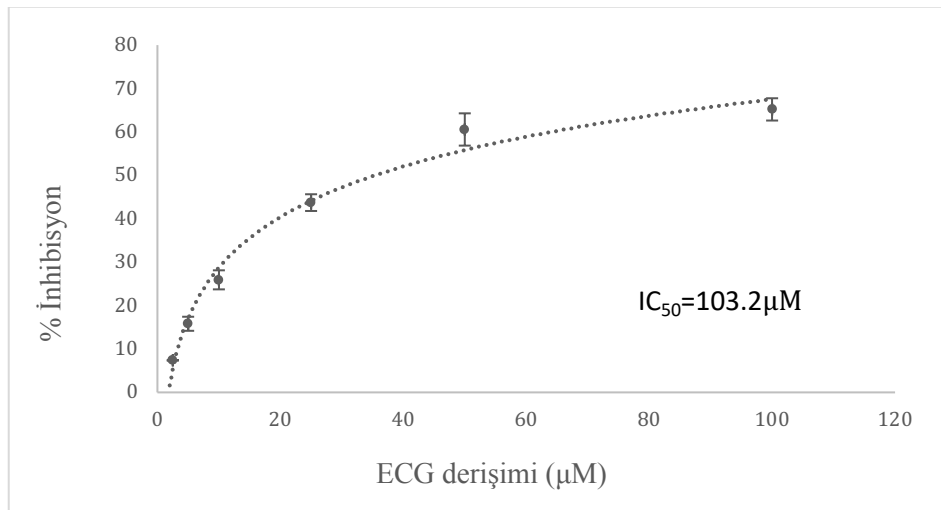
fenoliklerin hem enzime hem de enzim-substrat kompleksine farklı afiniteler ile bağlanabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4. 1. Michaelis Menten denkleğinden elde edilen plazmine ait inhibisyon kinetiğı parametreleri

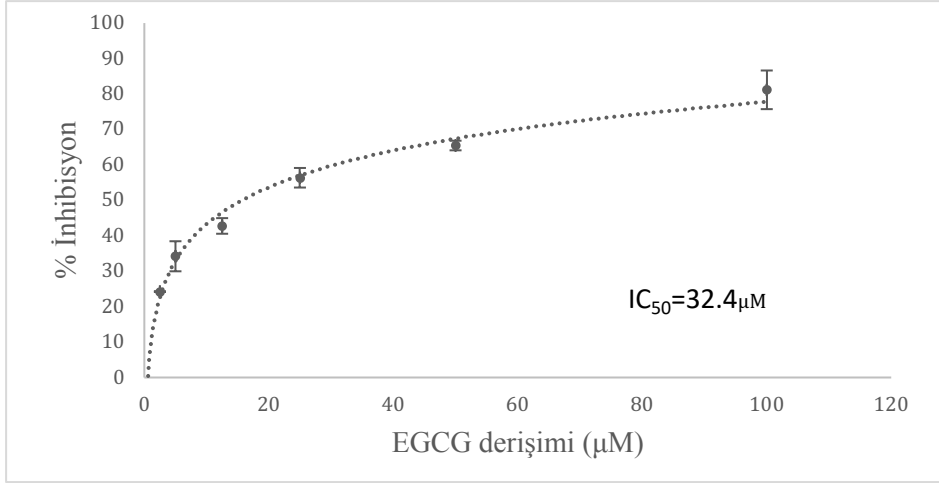
	Kontrol	ECG	EGCG	QUER	MYR	CURC
V_{\max}^{app} (a.u/dk)	450.4	82.7	78.5	198.9	85.4	80.8
K_m^{app} (mM)	0.631	0.291	0.71	0.611	0.74	0.34

Literatürde ECG'nin α -amilazda karışık tip inhibisyona yol açtığı [152], ve yine çay fenoliklerinin α -amilaz aktivitesi üzerine; kuersetinin ise pankreatik lipaz üzerine inhibitör etkisinin bu çalışmada bulunduğu gibi, yarışmasız olduğu belirtilmiştir [153,154]. ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC'nin değışen derişimlerdeki % inhibisyon değışleri Şekil 4.8-12'de gösterilmiştir.

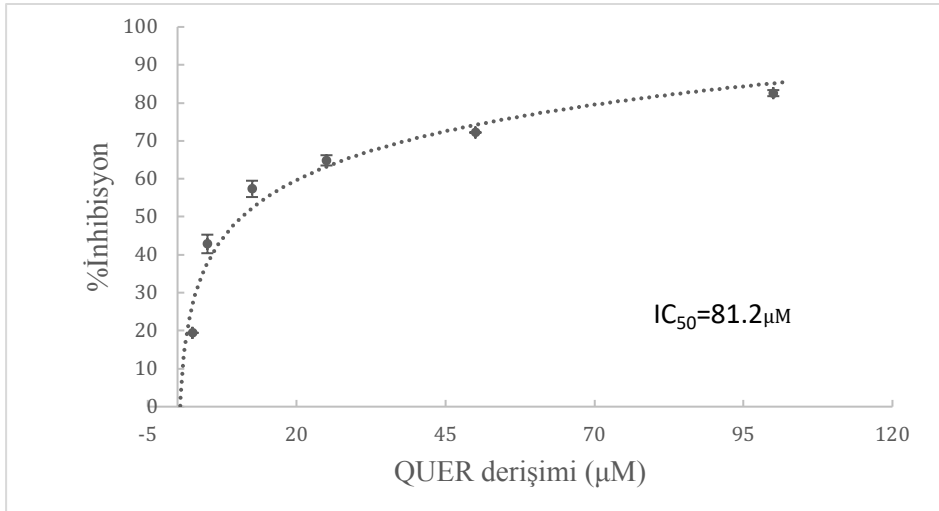
Enzim aktivitesinin yarı yarıya azalması için gerekli inhibitör derişimi olarak tanımlanabilecek IC_{50} değışleri, ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC için sıra ile, 103.2 μM , 32.4 μM , 81.2 μM , 33.7 μM , ve 198 μM olarak hesaplanmıştır.



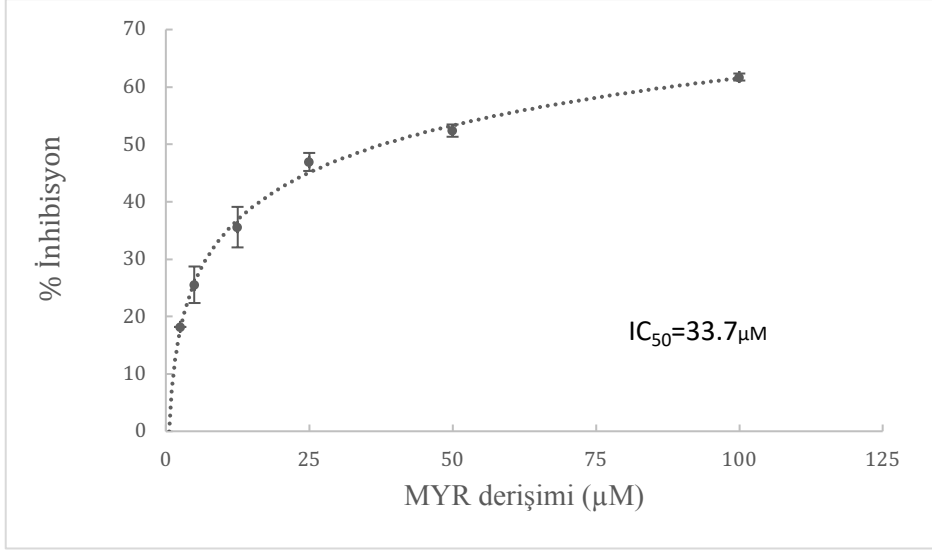
Şekil 4. 8. Epikateşin gallata (ECG) ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC_{50} değışleri.



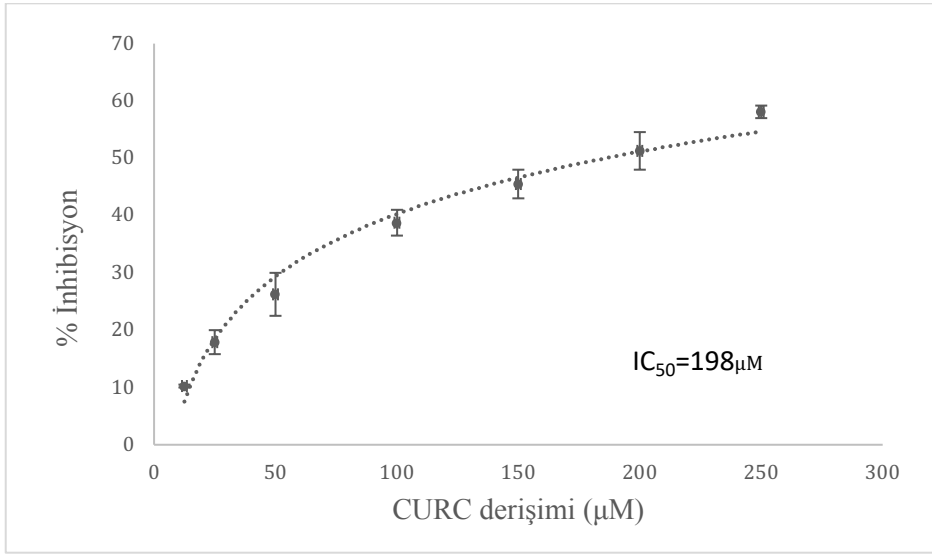
Şekil 4. 9. Epigallokateşin gallata (EGCG) ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC₅₀ değerleri.



Şekil 4. 10. Kuersetine (QUER) ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC₅₀ değerleri.



Şekil 4. 11. Myrisetine (MYR) ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC_{50} değerleri.

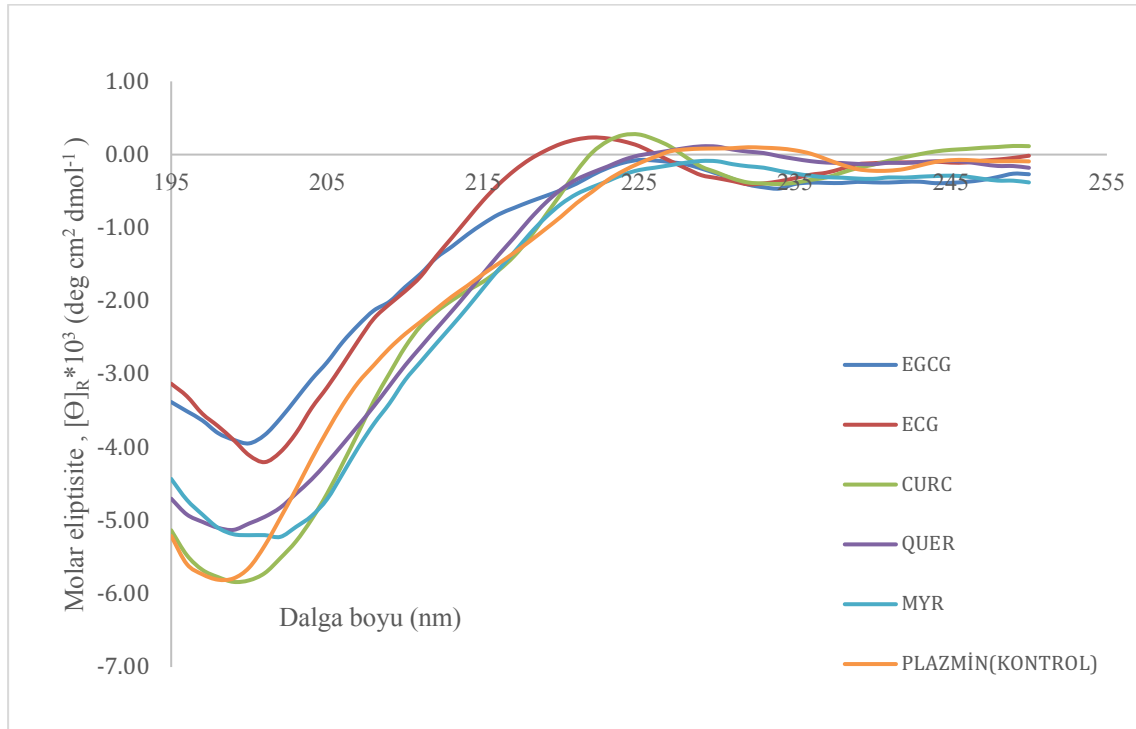


Şekil 4. 12. Kurkumine (CURC) ait plazmin inhibisyon oranları ve hesaplanan IC_{50} değerleri.

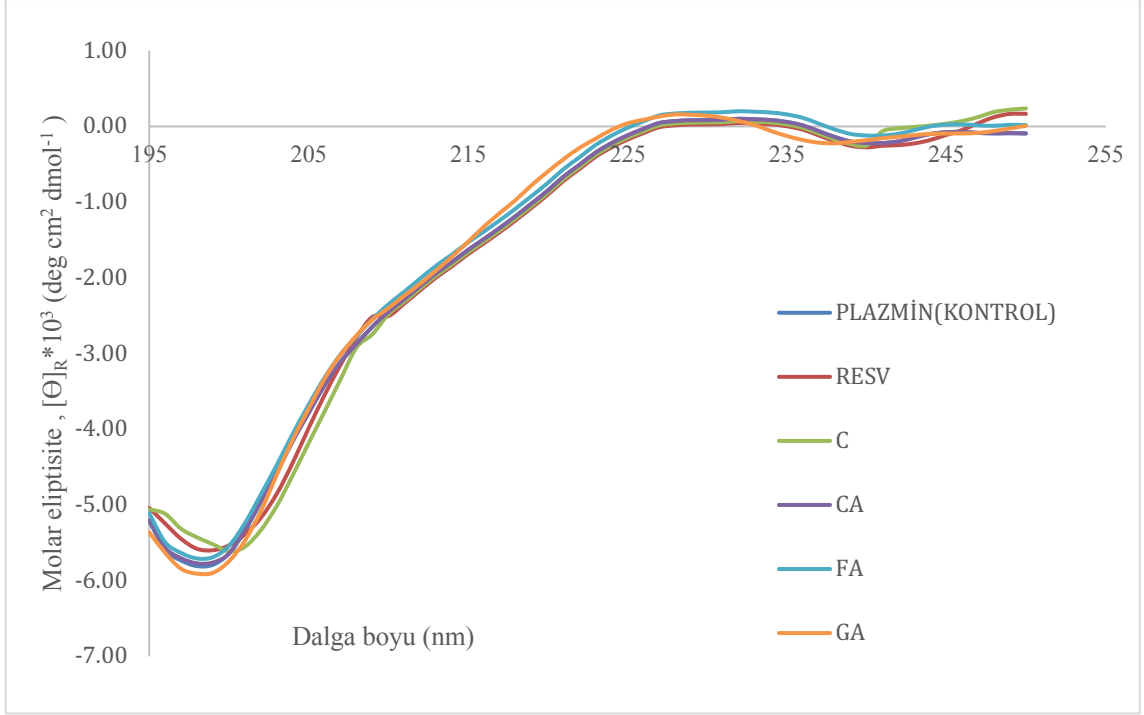
IC_{50} verileri değerlendirirken, aynı flavonoid sınıfına ait fenolik bileşikleri kıyaslamak anlamlı olacaktır. Bu anlamda, ECG'nin EGCG'ya göre plazmin inhibisyonunda daha yüksek IC_{50} değerlerine sahip olduğu ve QUER'in de MYR'e göre daha yüksek IC_{50} değerlerine sahip olduğu sonuçları, literatürde yapılan birçok araştırma ile de uyumludur [99, 149]. Flavonoidlerin B-halkasındaki -OH gruplarının sayısı, artan bağlanma afinitesi ve enzim inhibisyon oranları ile ilişkilendirilmektedir [149].

4.3. Fenolik Bileşikler ile Etkileşimin Plazmin Enziminin Sekonder Yapısı Üzerine Etkisi

Enzimlerin fenolik bileşikler tarafından inhibisyonları genellikle aralarındaki bağlanmaya istinaden ortaya çıkan enzim yapısındaki ve enzimin aktif bölgesindeki değişimler ile ilişkilendirilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da fenolik bileşiklerin inhibisyon mekanizmalarını belirlemek amacı ile fenolik bileşikler ile etkileştirilen plazminin konformasyonunda meydana gelmesi olası değişimler CD spektroskopisi ile belirlenmiştir.



Şekil 4. 13. Native plazmin (PLAZMİN (KONTROL)) ve plazmine karşı inhibitör özellik gösteren fenolik bileşik-plazmin komplekslerine (EGCG, ECG, CURC, QUER, MYR) ait far-UV CD spektrumları



Şekil 4. 14. Native plazmin (PLAZMİN (KONTROL)) ve plazmine karşı inhibitör özellik göstermeyen fenolik bileşik-plazmin komplekslerine (RESV, C, CA, FA, GA) ait far-UV CD spektrumları

İnhibisyon özelliği gösteren ve göstermeyen fenolik bileşikler ile inkübasyon sonrasında, plazmine ait far-UV spektrumları Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Elde edilen molar eliptisite dalarının işlenmesi ile hesaplanan ikincil yapı içerikleri ise Çizelge 4.2’de belirtilmiştir. Native haldeki plazminin ikincil yapısının daha çok düzensiz (rastgele) yapılardan oluştuğu; buna karşın düşük düzeyde düzenli yapılar içerdiği bulunmuştur. Bu anlamda, elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [155]. İkincil yapı denemelerinden elde edilen bulgulara göre, plazmin aktivitesinde azalmaya yol açan fenolik bileşikler ile etkileşim sonucunda plazminin ikincil yapısında önemli değişimler meydana geldiği; buna karşın inhibitör olmayan fenolikler ile inkübasyon sonrasında plazminin ikincil yapısını büyük oranda koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. İnhibitör fenolikler ile etkileşim sonucu, plazminin düzensiz yapısının daha düzenli bir yapıya doğru evrildiği, özellikle de bu yapılardan β -zincir ve döngü yapılarının oranının önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Her ne kadar, protein-polifenol etkileşimlerinin incelendiği birçok çalışmada bağlanmanın, proteinin ikincil yapısında düzensizliğe yol açtığını belirten çalışmalar çoğunlukta olsa da [67,156], düzensiz yapıların arttığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur [56]. Ayrıca, çalışma kapsamında bulunan veriler plazminin

termal denatürasyonu sırasında düzenli ikincil yapı oluşumuna doğru kayan konformasyon değişimi ile paralellik göstermektedir [157]. β -zincir yapılar genellikle proteinlerin agregasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Elde edilen veriler, ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC ile kompleks oluşturan plazminde benzer bir eğilimin olabileceği ve böylelikle enzimin fonksiyonelliğinin azalabileceği kanısını doğurmuştur.

Çizelge 4. 2. CDPro yazılımı ile CONTILL programı kullanılarak elde edilen, plazmin (kontrol) ve plazmin-fenolik komplekslerine ait ikincil yapı içerikleri

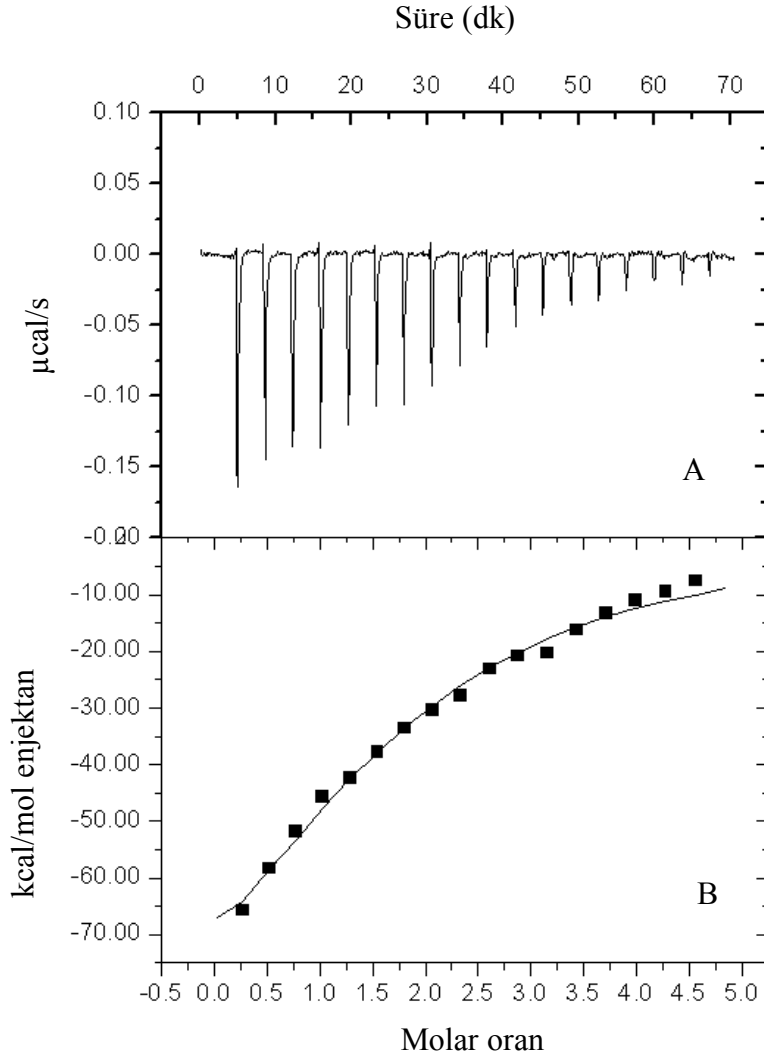
	α -heliks (%)	β -zincir (%)	Döngü (%)	Rastgele sarmal (%)	NKOS ^a
PLAZMIN (KONTROL)	2.2	11.9	12.6	73.3	0.213
GA	2.4	11.7	15.8	72.1	0.196
CA	2.6	12.7	13.5	73.2	0.21
FA	2.6	11.7	15.5	72.2	0.106
C	2.4	12.4	15	70.2	0.153
RESV	2.6	11.6	14.2	71.6	0.266
ECG	4.1	22.5	19	54.4	0.098
EGCG	6.1	20.8	16.7	56.4	0.142
MYR	4.3	21.5	16.9	57.2	0.148
QUER	2.6	22.5	20.2	54.7	0.205
CURC	3.1	17.9	13.8	65.2	0.276

^a Normalize karekök ortalamadan sapma

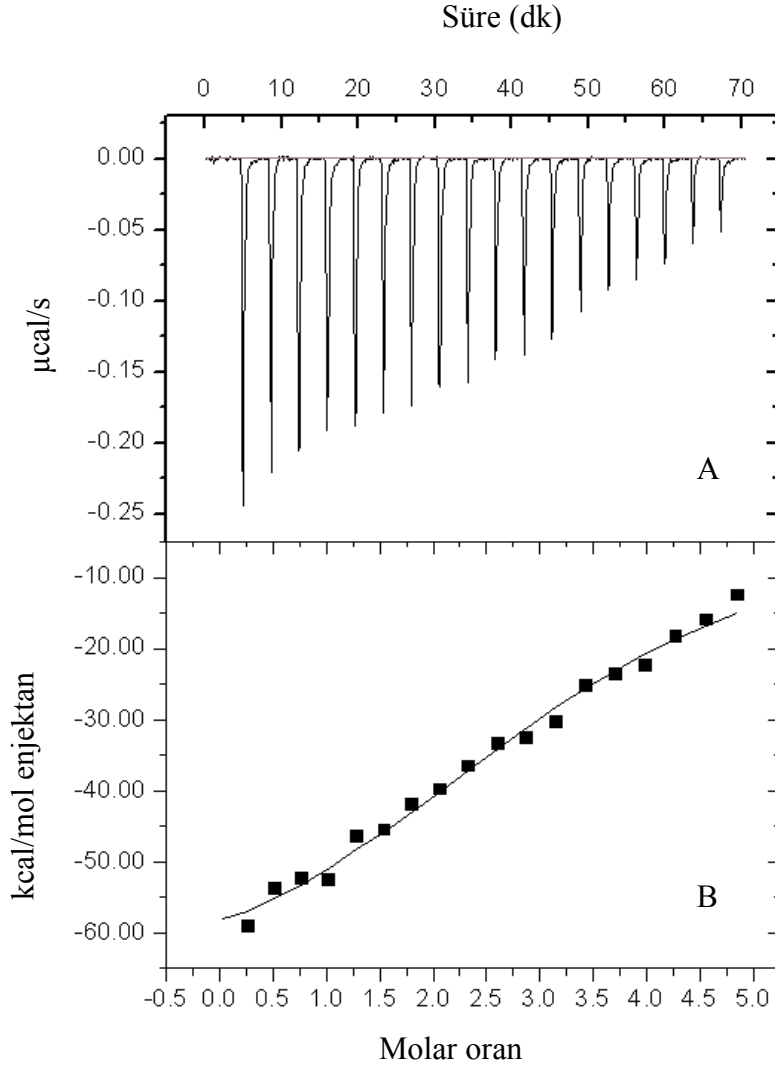
4.4. İnhibitör Fenolikler ile Plazmin Etkileşimlerinin Termodinamik Özellikleri

Protein-ligand bağlanma çalışmalarında, kalorimetrik metotlar bağlanmanın doğasını ortaya koyan ve sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu tez çalışmasında da, inhibitör fenoliklerin plazmin ile etkileşimlerinin termodinamik karakteristiklerini belirlemek amacı ile mikro izotermal titrasyon kalorimetresi (İTK) kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucu elde edilen izotermeler Şekil 4.15-19'da gösterilmiştir. Kurkumin (CURC) ile yürütülen analizlerde, kurkumin ve plazmin arasındaki etkileşimler sonucu açığa çıkan ısı değişimi, kurkumine ait seyrelme ısıları değerlerinden farklı bulunamadığından bu fenoliğe ait bağlanma karakteristiklerine ulaşılamamıştır. Kurkuminin, seyrelme ısıları

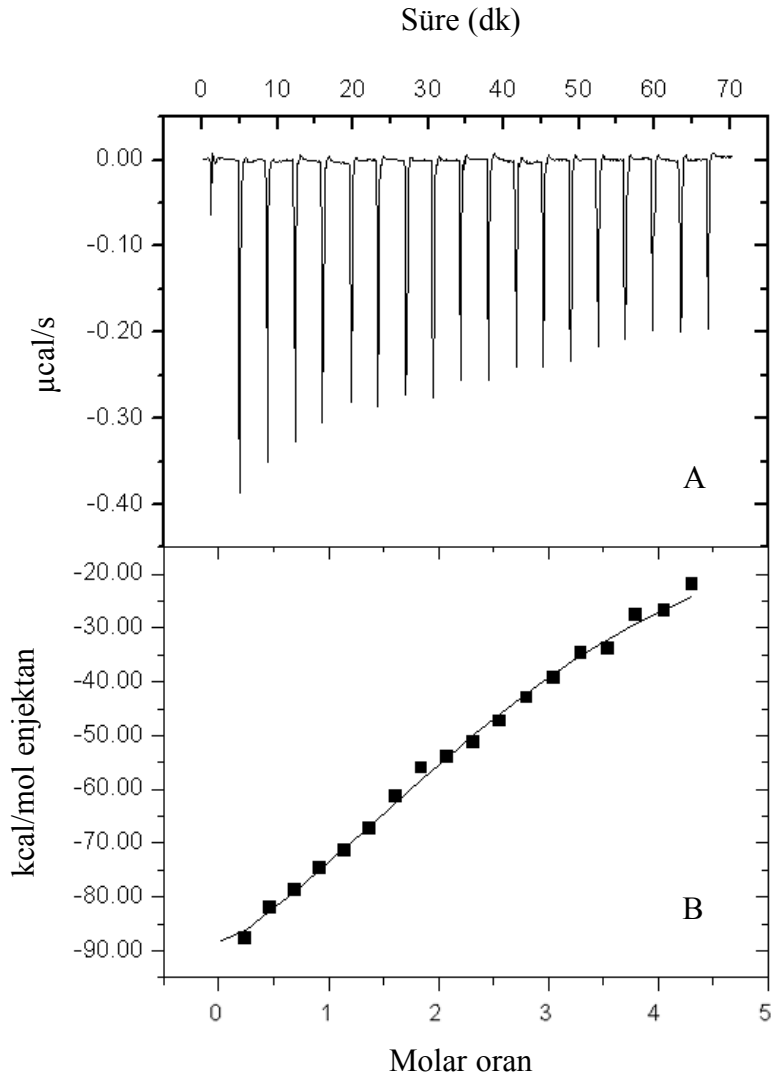
diğer organik çözücülere oranla daha yüksek olan DMSO'da çözünme gerekliliği bu sonucu doğurduğu düşünölmektedir.



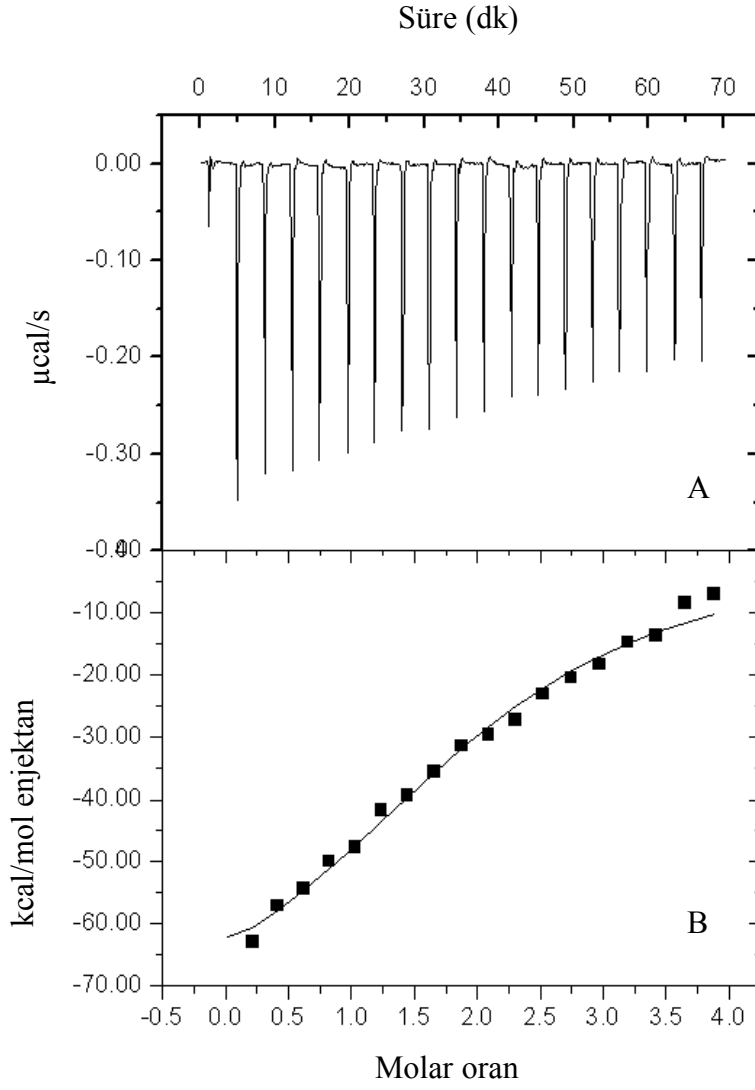
Şekil 4. 15. Plazminin ($2\mu\text{M}$), $50\mu\text{M}$ epikateşin gallat (ECG) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.



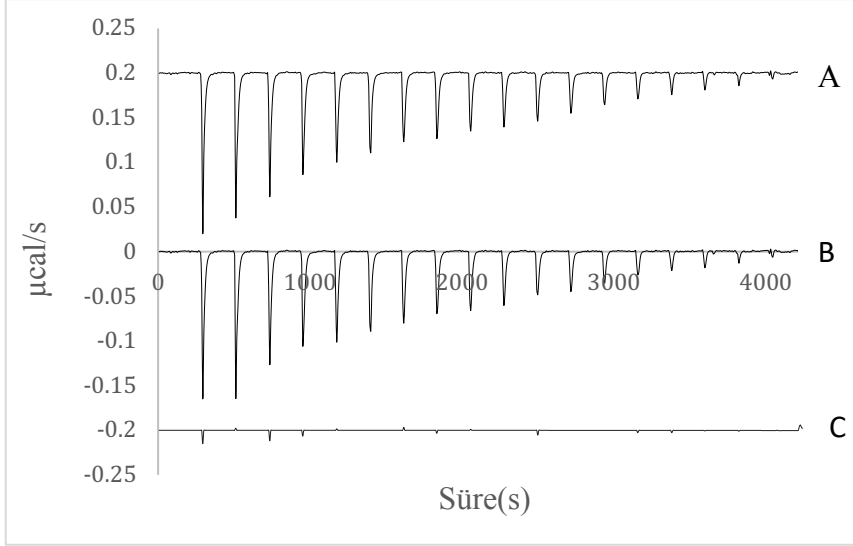
Şekil 4. 16. Plazminin ($2\mu\text{M}$), $50\mu\text{M}$ epigallokateşin gallat (EGCG) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.



Şekil 4. 17. Plazminin ($2\mu\text{M}$), $50\mu\text{M}$ kuersetin (QUER) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.



Şekil 4. 18. Plazminin ($2\mu\text{M}$), $50\mu\text{M}$ myrisetin (MYR) ile titrasyonuna ait İTK termogramı. Üst panel (A), plazminin ECG titrasyonu esnasında açığa çıkan ısı değerlerinin seyrelme ısısı çıkarıldıktan sonraki değerlerini göstermektedir. Alt panel ise (B) her bir pik alanının integrasyonu sonucu elde edilen izotermi göstermektedir; semboller deneysel verileri, sürekli çizgi ise bağımsız bağlanma bölgeleri modeline göre fit edilen eğriyi temsil etmektedir.



Şekil 4. 19. Plazminin ($2\mu\text{M}$), $50\mu\text{M}$ kurkumin (CUR) ile titrasyonuna ait İTK termogramı (A), seyrelme ısısını temsil eden kontrol denemesi (B) ve plazminin CURC ile titrasyonu sonucu açığa çıkan reaksiyon ısılarından kontrol reaksiyon ısılarının (seyrelme ısısı) çıkarılması ile elde edilen bağlanma ısısını temsil eden termogram (C)

İTK datasının 1:1 sitokiyometri ile 'bağımsız bağlanma bölgesi' modeline göre fit edilmesi ile elde edilen termodinamik parametreler Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Hesaplanan termodinamik parametreler değerlendirildiğinde; ECG, EGCG, QUER ve MYR ile plazmin arasındaki etkileşimlerin kendiliğinden gerçekleştiği ve ekzotermik karakteristikte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bulunan negatif ΔH ve buna oranla daha düşük ve yine negatif ΔS değerleri plazmin ile inhibitör fenolik bileşikler arasındaki oluşan komplekslerde baskın etkileşimlerin H-bağları ve van der Waals etkileşimleri olduğunu, bunun yanı sıra konformasyonel sınırlandırmaların da bir miktar etkin olabileceğini göstermektedir. Bağlanma sabitleri (K) incelendiğinde, flavonoidler içinde aynı alt sınıfta bulunan EGCG'in ECG'a göre daha yüksek afinite ile plazmine bağlandığı görülmektedir. Benzer şekilde MYR de, plazmine karşı QUER'e göre neredeyse 2 kat yüksek afinite göstermiştir. Bağlanma afinitesi verilerinin daha önce belirlenen plazmin inhibisyon oranları ve IC_{50} değerleri ile uyum içinde olduğu anlaşılmaktadır. Fenolikler ile plazmin arasındaki etkileşimlerin H-bağları ile domine edildiği düşünüldüğünde, MYR ve EGCG'de QUER ve ECG'a göre fazladan bulunan -OH grubunun, bağlanma afinitesi ve inhibisyon etkisini artırabileceği düşünülmektedir.

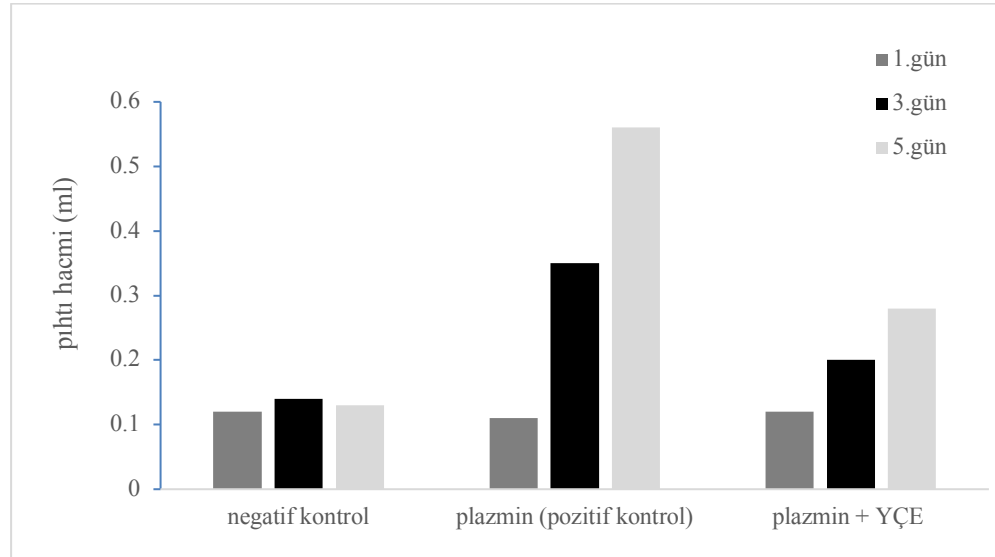
Çizelge 4. 3. İTK denemeleri ile plazminin ECG, EGCG, QUER ve MYR ile titrasyonu sonucu elde edilen termodinamik parametreler

	$K (M^{-1})$	$\Delta H (kJ/mol)$	$\Delta G (kJ/mol)$	$\Delta S (J/K mol)$
ECG	$3.74 \cdot 10^5 \pm 6.76 \cdot 10^4$	-460.2 ± 47.2	-27.3	-138
EGCG	$5.63 \cdot 10^5 \pm 9.69 \cdot 10^4$	-308.36 ± 16.02	-32	-90.2
QUER	$3.90 \cdot 10^5 \pm 4.69 \cdot 10^4$	-514.6 ± 24.07	-27.8	-158.9
MYR	$6.36 \cdot 10^5 \pm 8.46 \cdot 10^4$	-343.08 ± 21.24	-31.2	-101.8

4.5. YÇE'nin Sütün Plazmin ile Pıhtılaşmasına Etkisi

Plazminin kazeinler üzerine proteolitik aktivitesi sonucu açığa çıkan ve asit gelişmeksizin jelleşme (age-gelation) olarak adlandırılan durum, özellikle UHT sütlerin depolanması sırasında ortaya çıkabilen önemli bir kalite problemidir.

Plazmine karşı yüksek inhibisyon gösteren kateşin türevlerince zengin yeşil çay ekstraktı (YÇE) ilavesinin sütte plazmin enziminin aktivitesine etkisini belirlemek amacı ile yürütülen koagülasyon denemesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

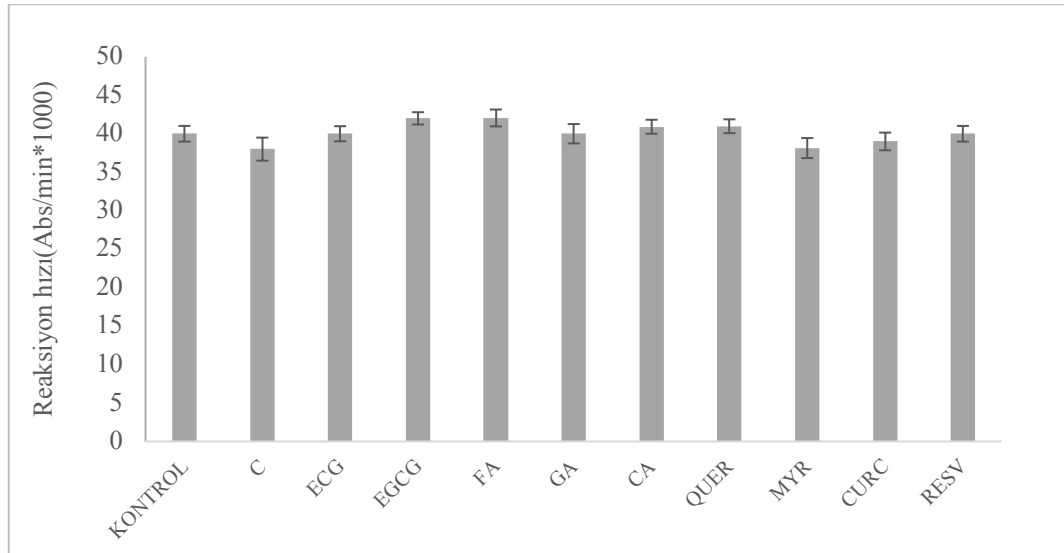


Şekil 4. 20. Plazminin kazeinler üzerine proteolitik aktivitesini gösteren pıhtı miktarları (mL) (negatif kontrol: süt+YÇE, pozitif kontrol: süt+plazmin, plazmin+YÇE: süt+plazmin+YÇE)

Plazmin aktivitesine bağı olarak gerçekleşen jelleşmeye bağı elde edilen pıhtı miktarlarının pozitif kontrol ve plazmin+YÇE örneklerinde zamanla artış gösterdiği belirlenmiştir. YÇE'nin plazmin aktivitesi üzerine etkisi analizin 1. gününde önemsiz düzeyde iken, 3. ve 5. günlerde YÇE ilave edilen süt örneğinde pozitif kontrol örneklere göre pıhtı miktarında önemli bir azalma olduğu görülmektedir. Bu da YÇE'nin sütte plazminin proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir.

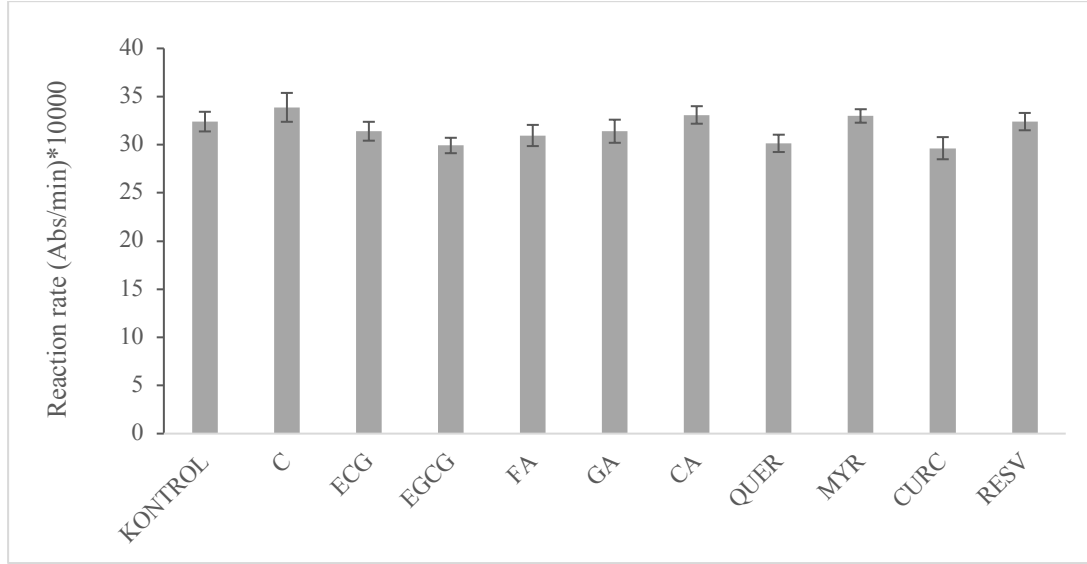
4.6. Fenolik Bileşiklerin Kimozin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Mevcut tez çalışmasında kullanılan 10 adet fenolik bileşik standardının (C, ECG, EGCG, QUER, MYR, RESV, CUR, FA, CA, GA) kimozen enzimine karşı inhibisyon etkisinin araştırılması amacı ile gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler sonucu, kimozen ve kimozen-fenolik komplekslerine ait reaksiyon hızları Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, çalışmada standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerden hiçbirinin kimozenin yapay substratı üzerindeki aktivitesinde önemli değişime yol açmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Süt matrisi içinde inkübe edilen kimozen-fenolik komplekslerine ait reaksiyon hızı değerlerinin de, model sistemlere benzer şekilde, kontrol örneklerden istatistiksel olarak önemli derecede farklı olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4. 21. Kimozin (KONTROL) ve her biri 500 μ M derişime sahip farklı fenolik bileşikler ile inkübe edilmiş kimozen-fenolik komplekslerine (C:kateşin, ECG:epikateşin gallat, EGCG:epigallokateşin gallat, FA:ferulik asit, GA:gallik asit, CA:kumarik

asit, QUER:kuersetin, MYR:myrisetin, CURC:kurkumin, RESV:resveratrol) ait reaksiyon hızı değerleri



Şekil 4. 22. Kimozin (control) ve her biri 500 μ M derişime sahip farklı fenolik bileşikler ile süt matrisinde inkübe edilmiş kimoziin-fenolik komplekslerine (C:kateşin, ECG:epikateşin gallat, EGCG:epigallokateşin gallat, FA:ferulik asit, GA:gallik asit, CA:kumarik asit, QUER:kuersetin, MYR:myrisetin, CURC:kurkumin, RESV:resveratrol) ait aktivite değerleri

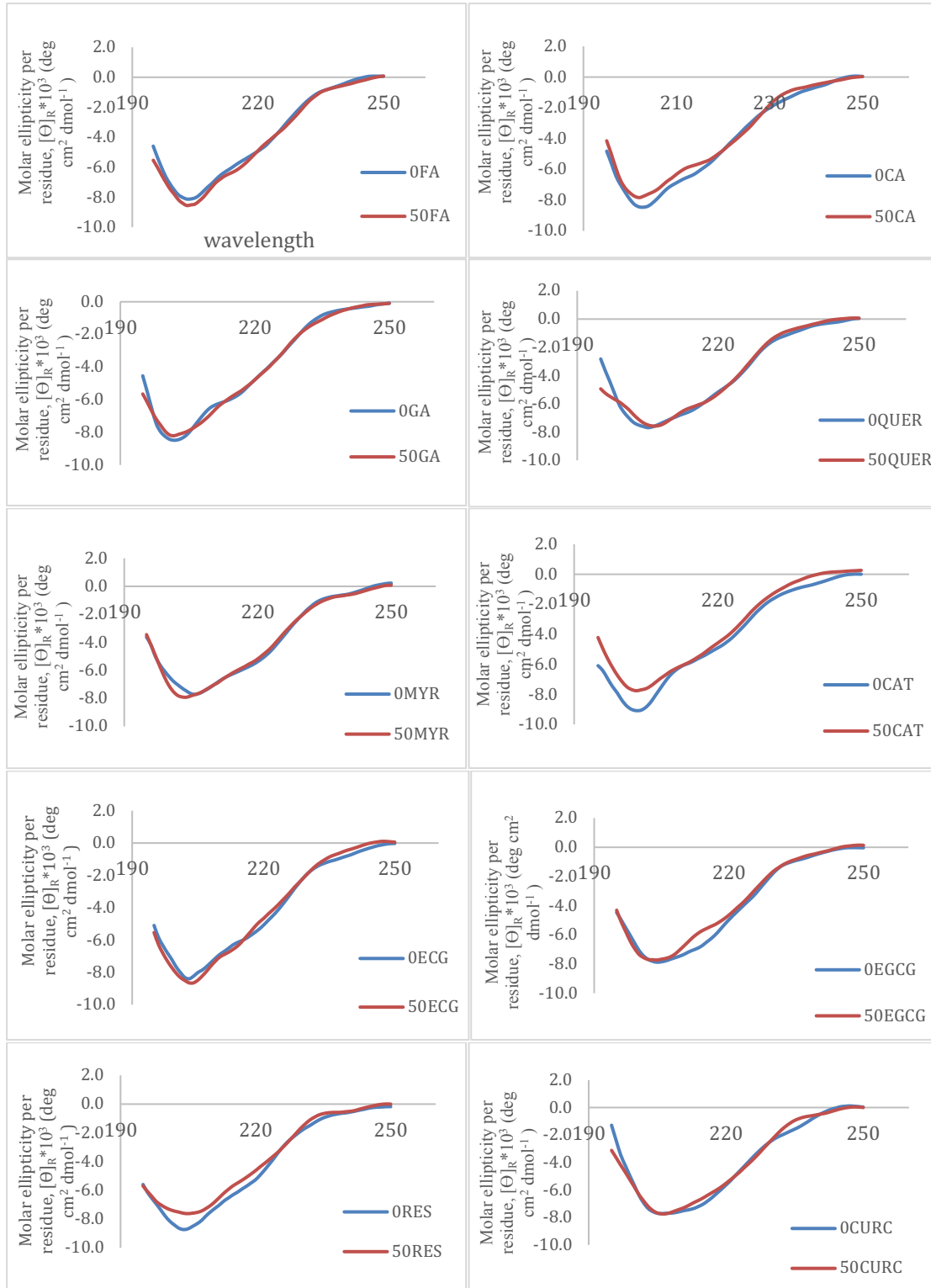
Literatürde şu ana kadar kimoziin ile ilgili veriler bulunmasa da, kimoziin gibi bir aspartik proteaz olan pepsinin, flavonoidler ile etkileşimi sonrası, aktif bölgede meydana gelen değişiklikler nedeni ile inhibisyona uğradığını rapor eden çalışmalar mevcuttur [158]. Benzer şekilde, Wu ve ark. [159] da EGCG'nin pepsini yarışmasız olarak inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Buna karşın, Tagliazucchi ve ark. [160], 3 farklı substratın sindirimi sürecinde flavonoid ilavesinin, pepsin aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Mevcut tez çalışmasında kullanılan fenolik asit ve flavonoidlerin kimoziinin yapay substratı üzerindeki aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir.

4.7. Fenolik Bileşikler ile Etkileşimin Kimoziinin Sekonder Yapısı Üzerine Etkisi

Çalışma kapsamında yürütölen kimoziin inhibisyonu denemelerinde, fenolik bileşiklerin kimoziine karşı inhibisyon özelliği göstermemesine rağmen, bu durumun moleküler

anlamda açıklanabilirliğini ortaya koymak amacı ile kimozin enzimi ve kimozin-fenolik komplekslerine ait ikincil yapı değerleri CD spektroskopisi ile belirlenmiştir. Elde edilen far-UV spektrumları Şekil 4.23’de gösterilmiştir.

Fenolik bileşik-kimozin komplekslerinde bulunan organik çözücü içeriklerinin, kimozinin konformasyonunda değişime yol açtığı ön denemeler ile belirlendiğinden, her bir fenolik için kontrol örnekleri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Kimozin ve kimozin-fenolik komplekslerine ait, 195-250 nm aralığında alınan far-UV spektrumlarından elde edilen molar eliptisite datalarının işlenmesi ile hesaplanan ikincil yapı içerikleri Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, kimozin enziminin ikincil yapısında, farklı fenolik bileşikler ile etkileşiminin ardından önemli bir değişimin oluşmadığı yönündedir. Fenolik bileşiklerin bazı enzimler ile kovalent ya da kovalent olmayan bağlar aracılığı ile oluşturduğu komplekslerin enzim inhibisyonuna yol açtığı, ve bu inhibisyonun çoğunlukla enzimin sekonder yapısında ve de özellikle aktif bölgesinde meydana gelebilecek değişimlerden kaynaklandığı literatürde belirtilmiştir [158]. Mevcut tez çalışması kapsamında yürütülen kimozin aktivitesi denemelerinde fenolik bileşik ile etkileşim sonrası değişmeyen enzim aktivitesi değerleri, kimozinin fenolik bileşikler ile etkileşim sonrası korunan ikincil yapısı ile açıklanabilir. Bu anlamda, fenolik bileşikler ile kurulan olası bağların çok zayıf olduğu ve/veya kimozinin görece korunaklı ve birçok H-bağı ile stabilize olmuş aktif bölgesinde [161] herhangi bir değişiklik yaratacak kadar etkin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4. 23. 50 μ M fenolik bileşik ile inkübe edilen (50FA, 50CA, 50GA, 50 CAT, 50 ECG, 50 EGCG, 50 RES, 50 QUER, 50 MYR, 50CURC) kimosin-fenolik komplekslerine (10 μ M) ve kontrol kimosin örneklerine (0FA, 0CA, 0GA, 0 CAT, 0 ECG, 0 EGCG, 0 RES, 0 QUER, 0 MYR, 0CURC) ait far-UV CD spektrumları

Çizelge 4. 4. Kimozin-fenolik komplekslerine (50EGCG, 50RESV, 50QUER, 50MYR, 50CURC, 50C, 50ECG, 50FA, 50CA, 50GA) ve kontrol kimozin örneklerine (0EGCG, 0RESV, 0QUER, 0MYR, 0CURC, 0C, 0ECG, 0FA, 0CA, 0GA) ait ikincil yapı içerikleri

	α -heliks (%)	β -zincir (%)	Döngü (%)	Rastgele sarmal (%)	NKOS ^a
0EGCG	16.6	14.4	27.8	41.2	0.108
50EGCG	17.2	13.9	26.7	42.2	0.088
0RESV	17.9	10.1	29.3	42.7	0.096
50RESV	18.4	11.6	26.2	43.8	0.094
0QUER	18.8	14.7	25	41.5	0.153
50QUER	19.2	12.9	27.3	40.6	0.122
0MYR	19	10.5	27.9	42.6	0.08
50MYR	16.4	10.9	29.7	43	0.094
0CURC	16.9	13.7	28	41.4	0.159
50CURC	19.2	9.6	28.7	42.5	0.118
0C	17.5	13.6	28.7	40.2	0.088
50C	17.4	15	26.1	41.6	0.104
0ECG	15	16.8	27.3	40.9	0.146
50ECG	16.4	14.9	26.8	42	0.145
0FA	19.8	10.5	27.8	42	0.093
50FA	20.7	10.3	28.2	40.7	0.134
0CA	13.2	17.6	29	40.2	0.147
50CA	14.8	16.3	26.8	42.1	0.125
0GA	15.6	16.8	25.4	42.2	0.136
50GA	16.3	13.1	27.8	42.8	0.137

^a Normalize karekök ortalamadan sapma

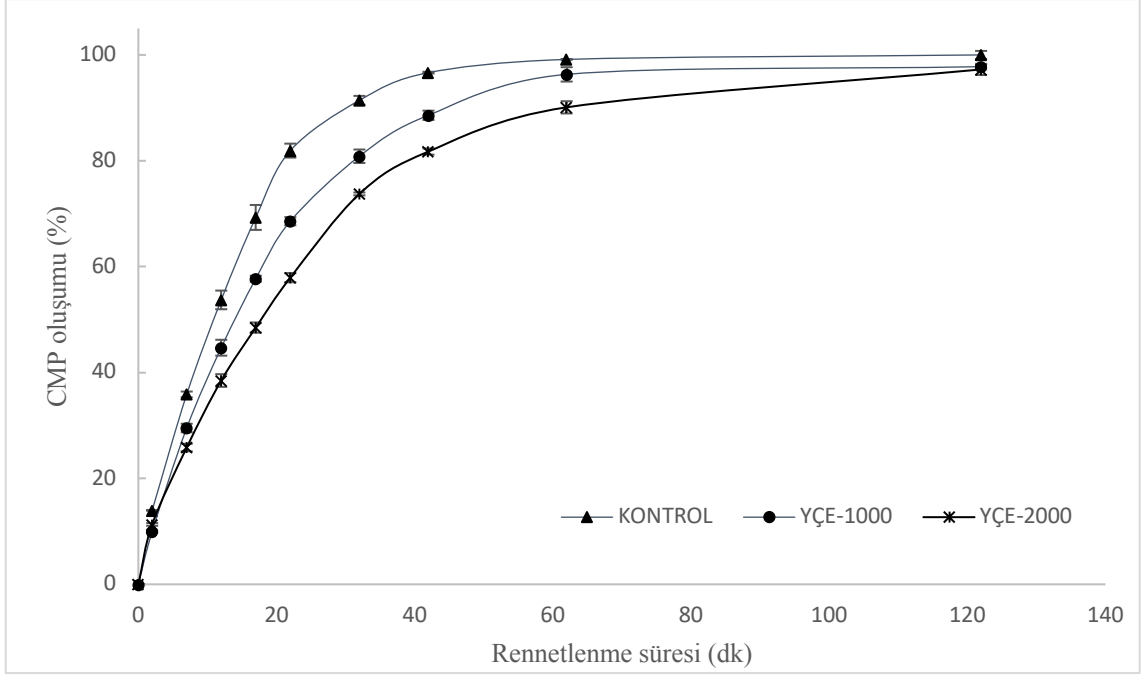
4.8. Kimozin-Fenolik Etkileşimlerinin Termodinamik Özellikleri

Yürütülen çalışmada, kimoziin inhibisyonuna neden olmasa da, fenolik bileşiklerin kovalent olmayan etkileşimlerle kimoziine bağlanabileceği düşünöldüğünden, bu bağlanmaların karakteristiklerini belirlemek amacı ile İTK denemeleri yürütölmüştür. Ancak İTK denemelerinde, enzim derişimi artırıldığında bile, fenolik bileşikler ile etkileşim sonucu açığa çıkan ısı değerleri, seyrelme ısısından farklı bulunmamıştır. Bu nedenle, fenolikler ile kimoziin arasındaki etkileşimlerin zayıf karakterde olduğu sonucu çıkarılmış ve fenoliklerin, enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik yaratacak kadar güçlü etkileşimlerde bulunmadığı öngörölmüştür.

4.9. YÇE İlavesinin Sütün Enzimatik Koagölasyon Sürecine Etkisi

Standart fenolik bileşikler ile yapılan denemelerin ardından, plazmin inhibisyonunda etkin rol oynayan kateşin türevlerini içeren bir ekstraktın, peynir yapımında kullanılmasının daha gerçekçi bir yaklaşım olacağı tartışılmıştır. Bu amaçla peynir üretimi ve olgunlaştırma süreçlerinde fenolik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile yeşil çay ekstraktı YÇE kullanılmasına karar verilmiştir.

Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında, kimoziin aktivitesi üzerine fenolik bileşiklerin inhibitör özellik göstermediği bulunsa da, süt matrisi içinde kimoziinin asal substratları olan kazeinlerin yüksek oranda fenolik bileşikler ile etkileşime girebildiği bilindiğinden, dolaylı da olsa inhibisyon görölebileceği öngörölmüştür. Bu amaçla, YÇE ilavesinin, peynir yapımı aşamasında, rennet ile koagölasyon sürecine etkisini belirlemek amacı ile CMP analizleri yürütölmüştür. Sütün rennet ile koagölasyon sürecinin ilk aşaması olan enzimatik fazda κ -kazeinin hidrolizi sonucu açığa çıkan ve serum faza geçen CMP (CMP A+CMP B) oluşumu, kontrol örnekler ile 1000 ppm ve 2000 ppm YÇE ilave edilmiş örnekler için Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

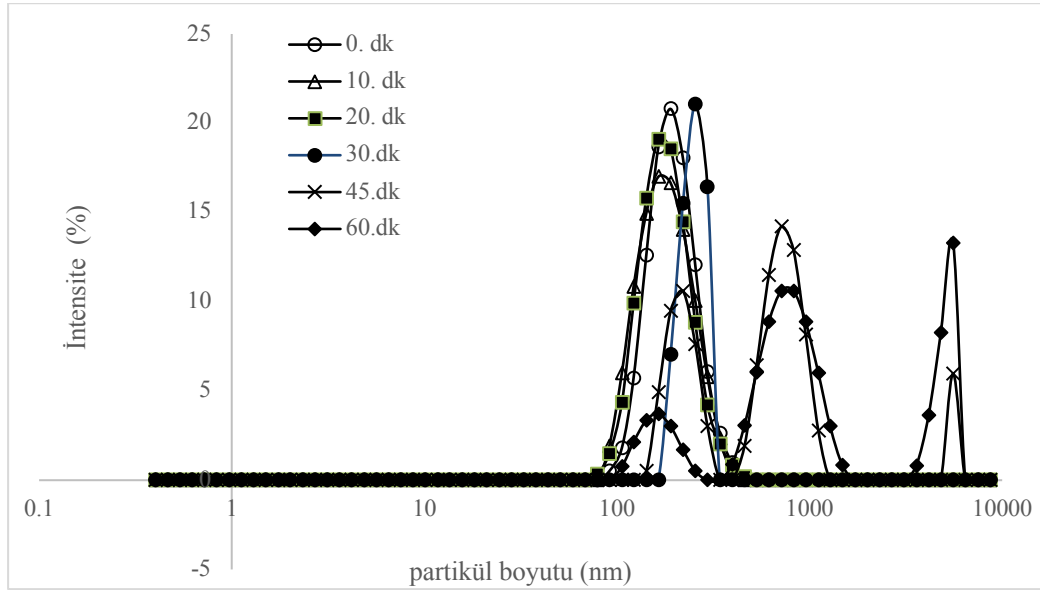


Şekil 4. 24. YÇE ilavesi olmayan kontrol örneği (KONTROL), 1000 ppm YÇE ilave edilen süt örneği (YÇE-1000) ve 2000 ppm YÇE ilave edilen süt örneğinde (YÇE-2000) rennetleme süresi boyunca relatif CMP (kazeinomakropeptid-(A + B)) miktarlarındaki değişim.

CMP analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm örneklerde rennetlenme sürecinin sonu olarak belirlenen 120 dk sonunda, oluşan CMP miktarları kontrol ve YÇE içeren örnekler için farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Ancak rennetlenmenin primer fazı ile ilişkili olan CMP oluşum trendi incelendiğinde, YÇE içeren süt örneklerinde CMP oluşum hızının kontrol örneğe göre daha yavaş olduğu ve YÇE derişimi arttıkça CMP oluşum hızının azaldığı görülmektedir. Bu durumun, kazeinler ve de spesifik olarak κ -kazeinin, YÇE fenolikleri ile etkileşime girerek, κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağının rennet tarafından erişilebilirliğini azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Her ne kadar süreç sonunda hidrolize uğrayan κ -kazein miktarlarında önemli bir fark olmadığı belirlense de, YÇE'nin rennet aktivitesini yavaşlatmasının, rennetlenme sürecinin ileri aşamasında para-kazein misellerinin agregasyonu ve oluşan rennet jelinin tekstürel özellikleri üzerine de etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Han ve ark. [64] da YÇE'nin de aralarında bulunduğu bir grup fenolikçe zengin ekstrakt kullanarak sütün koagülasyon sürecini değerlendirdiği çalışmada, tüm ekstraktların

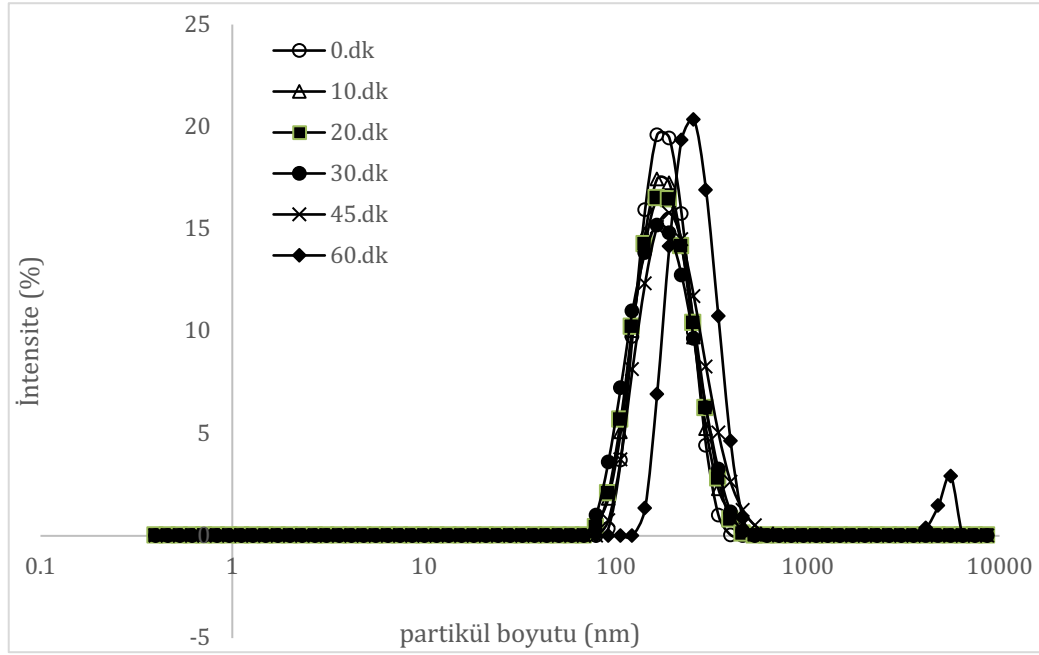
rennetlenme süreci ve koagülasyon parametrelerini etkilediğini rapor etmiş, ancak bu durumun gözlenmesinde pH değişiminin de önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara paralel şekilde, EGCG'ın sütün rennetlenme sürecini etkilediği ve bu süreçte CMP oluşum hızında azalma meydana geldiği; bu azalmanın da ilave edilen EGCG derişimi ile pozitif korelasyon içinde olduğu Haratifar ve Corredig [162] tarafından da rapor edilmiştir.



Şekil 4. 25. Kontrol süt örneklerinde kazein misellerinin ortalama boyut dağılımı (Enzim ilavesi öncesi (○) ve enzim ilavesinden 10 dk (Δ), 20 dk(■), 30 dk (●), 45 dk (×), 60 dk (◆) sonrasında alınan örnekler)

YÇE ilavesinin, koagülasyonun enzimatik fazı üzerine etkisinin belirlenmesinin ardından, kazein misellerinin flokülasyonuna etkisini belirlemek amacı ile DLS analizleri yürütülmüştür. YÇE ilavesi olmayan kontrol örneğe ve 1000 ppm derişimde YÇE içeren süt örneğine ait koagülasyon süresi boyunca hesaplanan misel boyutları Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da görülmektedir. Enzim ilavesi öncesinde, kazein misellerinin ortalama büyüklüğünün kontrol ve YÇE ilaveli örnekler için 184 ± 11 nm ve 174 ± 25 olduğu belirlenmiştir. Kazein miselleri sütte değişen çaplarda koloidal partiküller olarak bulunsa da, ortalama büyüklüklerinin 200 nm civarında olduğu rapor edilmiştir [163]. Fenolik bileşiklerin süt proteinlerine bağlandığı biliniyor olsa da [164], mevcut çalışma kapsamında YÇE ilaveli süt örneklerinde kazein misel boyutunda herhangi bir artış belirlenmemiştir. Benzer şekilde, Malekhosseini ve ark. [165] da EGCG'ın kazein

miselleri ile etkileşimi sonrasında misel boyutunda önemli bir değişim gözlenmediğini belirtmiştir. Kontrol süt örneklerinde kimozin ilavesinin ardından, koagülasyonun ilk 20 dakikasında, misel boyutunda yaklaşık 15 nm'lik bir azalma olduğu belirlenmiştir. YÇE ilaveli örneklerde ise benzer azalış 30. dk ya kadar gözlenmiştir. Misel boyutundaki bu azalışın, κ -kazeinin kimozin tarafından hidrolizi sonucu açığa çıktığı düşünülmektedir [166].



Şekil 4. 26. YÇE ilaveli süt örneklerinde kazein misellerinin ortalama boyut dağılımı (Enzim ilavesi öncesi (○) ve enzim ilavesinden 10 dk (Δ), 20 dk (■), 30 dk (●), 45 dk (×), 60 dk (◆) sonrasında alınan örnekler)

Bu bulgular, rennet ile koagülasyonun enzimatik fazının YÇE ilaveli örneklerde daha uzun sürdüğünü de destekler niteliktedir. Kontrol örnekler için 30, YÇE ilaveli süt örneklerinde ise koagülasyonun 45. dk sında kazein misellerinin ortalama çapının 280 nm civarına kaydığı görülmektedir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Bu durum, kazein misellerinin bir araya gelerek floküle olmaya başladığını göstermektedir. 45 dakika sonrasında ise kontrol süt örnekleri için ortalama 800 nm ve 5050 nm civarında iki adet ilave pik görülmektedir, bu boyutlarda açığa çıkan büyüklükteki partiküller de misellerin agrege olmaya başladığına işaret etmektedir. 60. dakikada ise, 800 nm piki intensitesindeki azalış ve beraberinde 5050 nm pikindeki artış, koagülasyonda jel oluşumundan bir önceki

basamak olan çok büyük agregatların oluştuğunu göstermektedir. Koagülasyon süreci boyunca misel boyutu değişiminde benzer eğilimler Freitas ve ark. [167] tarafından da rapor edilmiştir. 5050 nm boyutundaki büyük agregat intensitesinin kontrol örneklere göre oldukça düşük olması nedeni ile, YÇE ilavesinin süreç boyunca kazein misellerinin agregasyonunu da yavaşlattığı düşünülmektedir. Bunun için tez çalışması dahilinde önerilen olası iki mekanizma şu şekildedir; ilk senaryoda fenolik bileşiklerin metal iyonlarının şelasyonu ile Ca^{++} iyonlarının etkinliğinin azalması sonucu misellerin biraraya gelmesinin önlemiş olabileceği düşünülmektedir. İkinci olası nedenin ise, yine fenolik bileşikler ile kazeinlerin etkileşimi sonrası misellerin biraraya gelmesinde önemli olan atraksiyon güçlerinin dengelerinin değişmiş olabileceği, bunda da fenoliklerin iyonizasyonunun önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir. Bu iki olası mekanizmaya ek olarak, fenolik bileşiklerin sütte kazeinlerin kolloidal kararlılığını artırdığını belirten çalışmalar da mevcuttur [62].

Kazein misellerinin sahip olduğu net negatif yükün, enzimatik koagülasyon sürecinde κ -kazeinin hidrolizi ile oluşan sterik destabilizasyon sonucu azaldığı bilinmektedir [163]. Benzer bir eğilim, mevcut çalışma kapsamında da tespit edilmiştir. Kontrol ve YÇE ilaveli süt örneklerinde enzimatik koagülasyon sürecinde belirli zaman aralıkları ile ölçülen zeta potansiyeli değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Kontrol ve YÇE ilaveli süt örneklerinde enzimatik koagülasyon süreci boyunca ölçülen zeta potansiyeli değerleri

Süre (dk)	Kontrol	YÇE ilaveli süt
0	-19.2 ±0.2 ^{a,A}	-17.1±0.4 ^{a,B}
10	-14.9±0.5 ^{b,A}	-16.5±0.7 ^{a,A}
20	-14.2±0.2 ^{b,A}	-15.9±0.5 ^{ab,A}
30	-13.8±0.8 ^{b,A}	-13.3±0.3 ^{b,A}
45	-13.4±0.4 ^{b,A}	-14.0±0.8 ^{b,A}
60	-12.1±0.2 ^{bc,A}	-14.1±0.2 ^{ab,B}

Aynı satırdaki farklı büyük harfler ile, aynı sütündeki farklı küçük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir (p<0.05) n=2

Kontrol süt örnekleri ile YÇE ilaveli süt örnekleri kıyaslandığında zeta potansiyelleri arasında dramatik bir fark belirlenememiştir. Koagülasyon süreci boyunca her iki örnekte de zeta potansiyelinin zamanla azalması, κ -kazeinin hidrolize uğramasının sonucudur [133]. Ancak koagülasyonun tamamlanmasının ardından da örneklerde misellerin net

negatif yüke sahip olduğu görülmektedir. Bunun yanısıra, YÇE ilaveli süt örneklerinde EGCG'nın $> \text{pH } 5$ olduğu durumlarda iyonizasyonunun da net negatif yüke etki edebileceği düşünülmektedir [168]. Bu nedenle koagülasyon sürecinde zeta potansiyeli ile yapılan değerlendirmenin uygun olmayabileceği tartışılmıştır.

4.10. Peynir Sütü Kimyasal Kompozisyonu

Tez çalışması kapsamında sütün enzimatik koagülasyonu denemeleri ve minyatür peynir üretiminde kullanılan süt örneklerine ait genel kompozisyon değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 6. Çalışmada kullanılan süt örneklerinin genel kompozisyonu

pH	6.65± 0.1
Kuru madde içeriği (%)	12.4± 0.5
Protein içeriği (g·L⁻¹)	32.5± 2.1
Yağ içeriği (%)	3.7± 0.2

4.11. Olgunlaşma Sürecinde Minyatür Peynir Örneklerine Ait Analiz Sonuçları

4.11.1. Rutubet Değerleri

Laboratuvar ölçekli olarak üretimi gerçekleştirilen minyatür peynir örneklerinde hesaplanan rutubet değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Peynir örneklerinin rutubet değerleri %50.22 ile %56.83 arasında değişmektedir. YÇE ilave edilerek üretilen ve kontrol peynirlerde üretimden hemen sonra belirgin rutubet farkı görülmemektedir.

Çizelge 4. 7. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince rutubet miktarları (%)

	1.gün	15.gün	30.gün	60.gün
Kontrol peynir	56.05±0.88 ^{a,A}	53.5±1.07 ^{a,A}	52.16±1.03 ^{a,A}	52.58±2.41 ^{a,A}
YÇE-peynir	56.83±2.6 ^{a,A}	52.44±1.35 ^{a,A}	51.53±0.89 ^{ab,A}	50.22±0.15 ^{ab,A}

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ile, aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir (p<0.05) n=2

Olgunlaşma süreci boyunca, her iki peynir örneği için de rutubet değerlerinde azalma meydana geldiği görülmektedir. Elde edilen veriler, YÇE ilavesinin peynirin rutubet değeri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermektedir ($p>0.05$). Benzer şekilde Giroux ve ark [169] de 1000ppm YÇE ilavesi ile hazırlanan Cheddar tipi peynirlerde nem içeriğinin YÇE ilavesinden bağımsız olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise üzüm kabuğu ekstraktı ilavesinin, peynir pıhtısındaki nem içeriğini artırdığı rapor edilmiştir [170].

4.11.2. Toplam protein içeriği

Peynir örneklerinin kuru madde bazında içerdikleri toplam protein miktarları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Olgunlaşma süresince, kontrol peynir ve YÇE ilaveli peynir örneklerinin protein içeriklerinde az miktarda artış ya da azalma gözlenmektedir. Bu durum peynirde meydana gelen proteolizin bir sonucudur. Veriler incelendiğinde, yeşil çay ilavesinin, peynirin toplam protein içeriği üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Elde edilen veriler Cheddar peyniri ile yapılan araştırma ile de uyumluluk göstermektedir [169].

Çizelge 4. 8. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince kuru madde üzerinden toplam protein değerleri (%)

	1.gün	15.gün	30.gün	60.gün
Kontrol peynir	33.4±0.18 ^{a,A}	33.49±3.65 ^{a,A}	34.28±2.73 ^{a,A}	33.98±2.13 ^{a,A}
YÇE-peynir	32.2±2.44 ^{a,A}	34.28±1.67 ^{a,A}	33.84±0.04 ^{a,A}	35±1.88 ^{a,A}

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ile, aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$) n=2

4.11.3. pH değerleri

Minyatür peynir örneklerinin 60 günlük olgunlaşma sürecinde sahip oldukları pH değerleri Çizelge 4.9'de verilmiştir. Peynir üretiminin ilk günü kontrol peynir örneğinin pH değeri 5.21; YÇE ilaveli peynirin pH değeri ise 5.3 olarak ölçülmüştür. Olgunlaşma süresi ilerledikçe peynirlerin pH düzeylerinde azalma meydana gelmiş ve olgunlaşmanın sonunda kontrol peyniri 4.61 pH'ya ulaşırken; YÇE'li peynirin pH'sı ise 4.58 olarak ölçülmüştür. Olgunlaşma süresinin peynirlerin pH değerleri üzerine etkisi önemli olmakla

birlikte ($p<0.05$), yeşil çay ilavesinin pH değerine önemli bir etkisi görülmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4. 9. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince pH değerleri

	1.gün	15.gün	30.gün	60.gün
Kontrol peynir	5.21±0.18 ^{a, A}	4.76±0.15 ^{b, A}	4.68±0.03 ^{b, A}	4.61±0.03 ^{b, A}
YÇE-peynir	5.4±0.24 ^{a, A}	4.74±0.17 ^{b, A}	4.62±0.04 ^{b, A}	4.58±0.02 ^{b, A}

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ile, aynı sütundaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir ($p<0.05$) n=2

4.11.4. Plazmin Aktivitesi

Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında fenolik bileşiklerin, plazmin enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin belirlenmesinin ardından, aynı etkinin, çok daha dinamik bir yapıya sahip olan peynir yapısı içinde de görülebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yürütülen, kontrol ve YÇE ilaveli peynir örneklerinde ölçülen plazmin aktivitesi değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca plazmin aktivitesi miktarında bir miktar artış gözlenirse de, bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Plazmin aktivitesinin olgunlaşma sürecinde değişimi ile ilgili literatürde çelişkili veriler bulunmaktadır. Farklı peynir türleri ile yapılan çalışmalar, peynir matriksinin plazmin aktivitesi üzerinde önemli olduğunu göstermektedir [171]. Bunun yanı sıra, peynir yapımı aşamasında süte uygulanan ısı işlemi, pıhtı yıkama aşamaları, pıhtıya uygulanan haşlama işlemi ya da depolama sıcaklığı gibi teknolojik parametrelerin de plazmin aktivitesi üzerine önemli etkisi olduğu belirtilmektedir [171]. Mevcut çalışma kapsamında elde edilen bulgular İsviçre tipi (Swiss-type) peynirler ile yapılan çalışma ile paralellik gösterirken [172], istatistiksel olarak önemsiz olsa da süreç boyunca bir miktar artış gösteren plazmin aktivitesinin, süte uygulanan ısı işlemi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [117, 173]

Çizelge 4. 10. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince ölçülen plazmin aktivitesi değerleri (nmol 7-amino-4-methyl coumarin dk⁻¹.g (kuru madde)⁻¹)

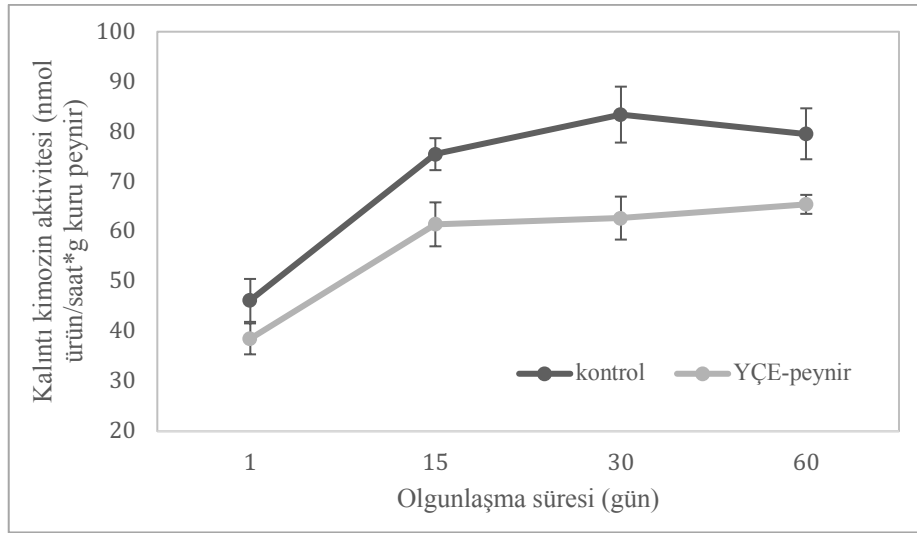
	1.gün	15.gün	30.gün	60.gün
Kontrol peynir	4.258±0.069 ^{a,A}	4.738±0.257 ^{a,A}	4.595±0.018 ^{a,A}	5.096±1.014 ^{a,A}
YÇE-peynir	3.952±0.291 ^{a,A}	4.584±0.637 ^{a,A}	4.777±0.304 ^{a,A}	4.857±0.465 ^{a,A}

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ile, aynı sütündeki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir (p<0.05) n=2

YÇE ilavesinin, peynirlerin olgunlaşma sürecinde plazmin aktivitesi değerlerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0.05) (Çizelge 4.10). Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında model sistemlerde kullanılan fenolik bileşiklerin, plazminin ikincil yapısı üzerine etki ederek inhibisyona yol açtığı öne sürülmüştü. YÇE'nin inhibisyon etkisinin standart fenoliklerden daha az olması öngörülebilir bir durum olsa da, plazmin aktivitesinde YÇE'ye bağlı olarak herhangi bir azalma görülmemesinin birkaç nedeni olabileceği tartışılmıştır. Öncelikli olarak, peynir yapımı aşamasında süte ilave edilen YÇE'nin suda çözünür özelliği nedeni ile, önemli bir miktarının whey uzaklaştırılması aşamasında pıhtı yapısından ayrılmasının söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Ancak yine de literatürde, yeşil çay ekstraktı kullanılarak üretilen peynirlerde, peynir yapısında kalan fenolik bileşiklerin önemli düzeyde olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [64,169]. Plazmin analizi esnasında plazminin kazein misellerinden ayrılarak analiz edilebilmesini sağlayan işlemlerin, plazmin aktivitesinde hatalı sonuçlara yol açabileceği de tartışılmış ve özellikle düşük enzim aktivitesi değerleri için sonuçların yanıltıcı olabileceği dile getirilmiştir [113, 174]. Bunun yanı sıra, plazminin oldukça karmaşık bir enzim sisteminin parçası olması sebebi ile, sistemin diğer bileşenlerinin de YÇE ilavesinden olası etkilenme durumunun bu sonucu doğurmuş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tez çalışmasının ilk aşamasında moleküler düzeydeki plazmin inhibisyonu değerlendirme analizleri saf fenolik bileşikler ile değerlendirilmiş olup, YÇE'nin sütte plazmin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile pıhtı oluşumu değerlendirilmiştir. Peynirde plazmin aktivitesi analizinde plazminin sentetik substratı üzerine aktivitesi belirlendiğinden, süt ve peynir matrislerindeki aktivite değişimlerinin doğrudan kıyaslanmasının uygun olmadığı düşünülmektedir.

4.11.5. Kalıntı Kimozin Aktivitesi

Peynirin olgunlaşma sürecinde, kazeinlerin yıkımından sorumlu başlıca enzimlerden olan kimozinin peynir pıhtısında kalan miktarı ve aktivitesi pek çok teknolojik parametreye göre değişiklik gösterebilmektedir. Olgunlaşma süresince birincil proteoliz ile ilişkilendirilen kalıntı kimozin aktivitesi doğrudan ya da dolaylı olarak peynir aroma ve tekstürüne katkı sağlamaktadır. YÇE fenoliklerinin peynir olgunlaşma sürecinde kalıntı kimozin aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 27. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde (YÇE-peynir) olgunlaşma süresince ölçülen kalıntı kimozin aktivitesi değerleri (nmol ürün/saat · g kurutulmuş peynir)

Olgunlaşmanın ilk gününden itibaren her iki peynir örneği için de kimozin aktivitesinin zamana bağlı olarak artan bir eğilim içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde kimozin aktivitesinin, süreç boyunca kontrol peynirlere göre daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Projenin ilk aşamasında, model sistemler ile elde edilen veriler kimozinin ikincil yapısının fenolik etkileşimlerinden önemli ölçüde etkilenmediği, bu nedenle aktivitesinde değişime yol açmadığı yönünde idi. Buna karşın, sütün rennet ile koagülasyon sürecinde kimozin aktivitesinin yeşil çay fenolikleri varlığında bir miktar azalma göstermesi; kazeinler ile etkileşime giren fenoliklerin, kazeinlerin kimozin tarafından hidrolizinde sterik bir engel oluşturabileceği düşüncesi ile bağdaştırılmıştır. Olgunlaşma sürecinde de, kontrol örneklere oranla, YÇE ilaveli peynir

örneklerinde kalıntı kimozin aktivitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Model sistemlerdeki değişmeyen kimozin aktivitesi sonuçlarına karşın, peynir yapımı ve olgunlaşma aşamalarında elde edilen bulguların, değişen ortam şartları ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Peynirin, yapım aşamasından itibaren sürekli değişen bir yapıya sahip olduğu düşünüldüğünde, olası enzim-fenolik-protein etkileşimlerinin bu süreçten etkilenmesi olasıdır.

4.11.6. Olgunlaşma Sürecinde YÇE İlavesinin Proteoliz Düzeyine Etkisinin Değerlendirilmesi

pH 4.6'da çözümlü azotlu madde miktarı, peynirin olgunlaşma süresince uğradığı en temel proseslerden proteoliz hakkında önemli ip uçları vermektedir. pH 4.6'da çözümlü azot miktarının öncelikli olarak kalıntı kimozin ve daha az oranda da plazmin kaynaklı olduğu bilindiğinden, elde edilen veriler oldukça büyük önem taşımaktadır.

Çizelge 4. 11. Kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince pH 4.6'da çözümlü azotlu maddelerin toplam azotlu madde miktarına oranı (%)

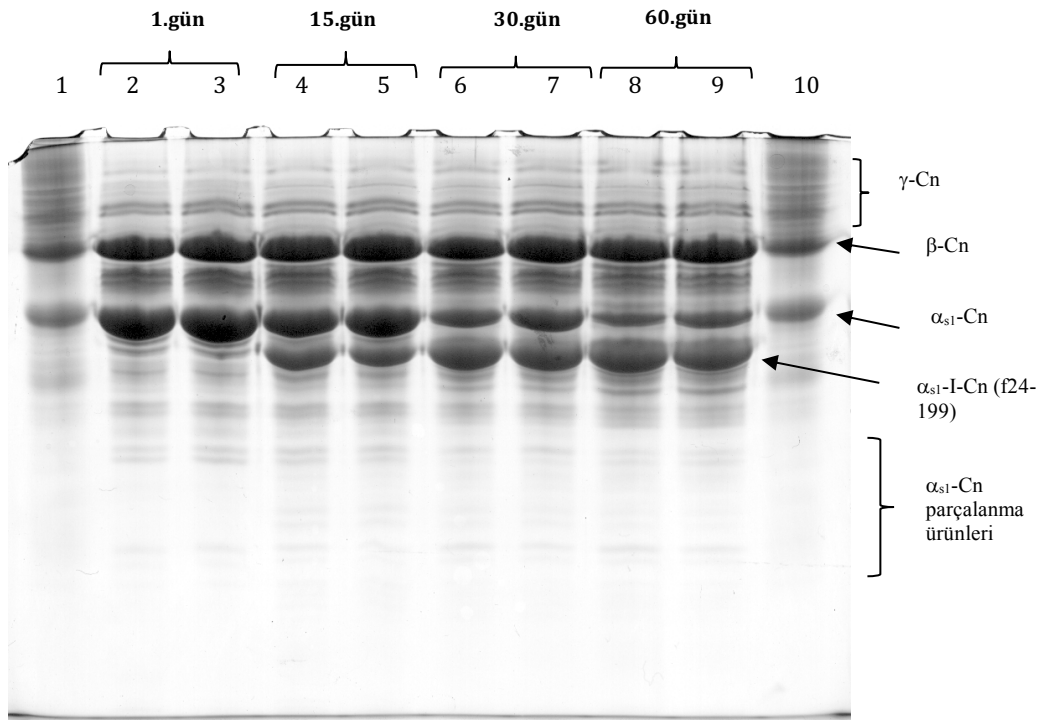
	1.gün	15.gün	30.gün	60.gün
Kontrol peynir	8.67±0.73 ^{a,A}	11.54±0.5 ^{b,A}	14.38±0.09 ^{c,A}	15.84±0.03 ^{d,A}
YÇE-peynir	7.47±0.92 ^{a,A}	8.91±0.38 ^{a,B}	10.29±0.25 ^{b,B}	11.95±0.69 ^{c,B}

Aynı satırdaki farklı küçük harfler ile, aynı sütundaki farklı büyük harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtmektedir (p<0.05) n=2

Çizelge 4.11'de peynir örnekleri için elde edilen pH 4.6'da çözümlü azot miktarları, örneklerdeki toplam azotlu madde miktarlarına oranı % olarak ifade edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; kontrol ve YÇE ilaveli peynirler incelendiğinde, 60 günlük olgunlaşma süreci boyunca çözümlü azotlu madde miktarlarının, beklenildiği gibi, zamanla artış gösterdiği görülmektedir ve bu durum olgunlaşma sürecinde ilerleyen proteolizin bir göstergesidir. YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde pH 4.6'da çözümlü azotlu madde miktarının kontrol peynirlere göre istatistiksel olarak daha az olduğu bulunmuştur (p<0.05). Giroux ve ark. [169] da, yeşil çay ekstraktı ilavesinin, Cheddar peynirde suda çözümlü azot miktarında %14-18 oranında azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da peynirde birincil proteolizin YÇE ilavesi ile %13-24 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, plazminin olgunlaşma süresince önemli bir inhibisyona uğramadığı belirlendiğinden, pH 4.6'da çözümlü azotlu madde miktarındaki

azalışın büyük oranda kalıntı kimozeninden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumun, daha önce de belirtildiği gibi kazeinlerin yeşil çay fenolikleri ile olası etkileşimlerinin yol açtığı sterik engelden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Olgunlaşma süreci boyunca proteolizin incelenmesi amacı ile yürütülen bir diğer analiz olan üre-PAGE analizinde, kontrol ve YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde 60 günlük olgunlaşma sürecinde alınan örneklere ait elektroforetogramlar Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



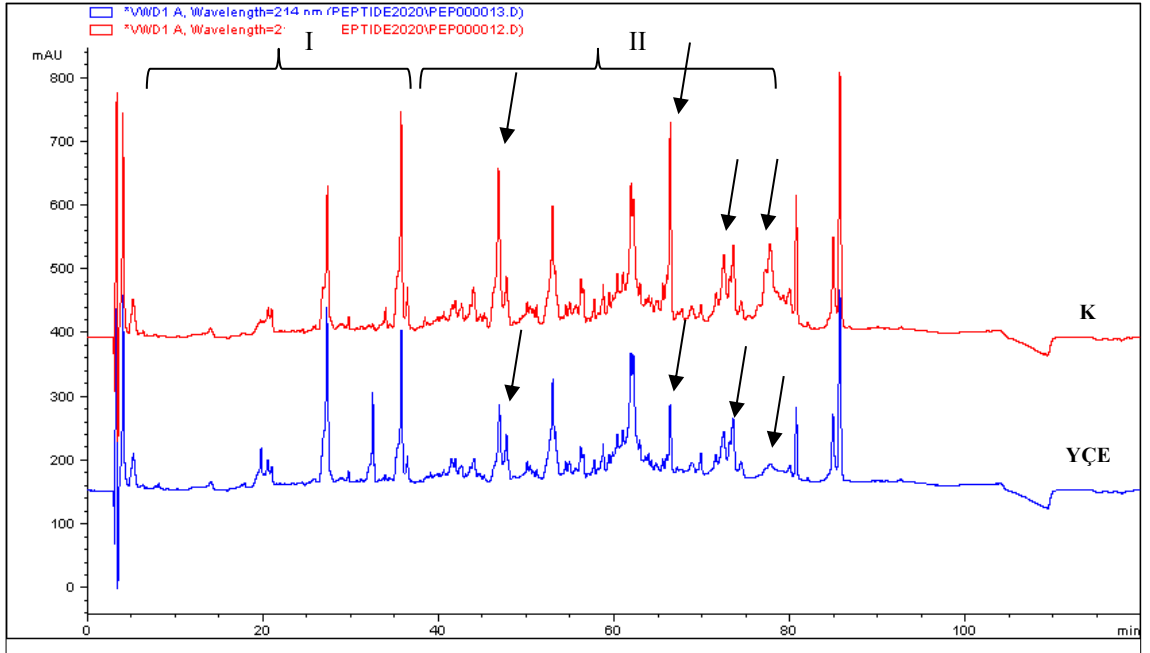
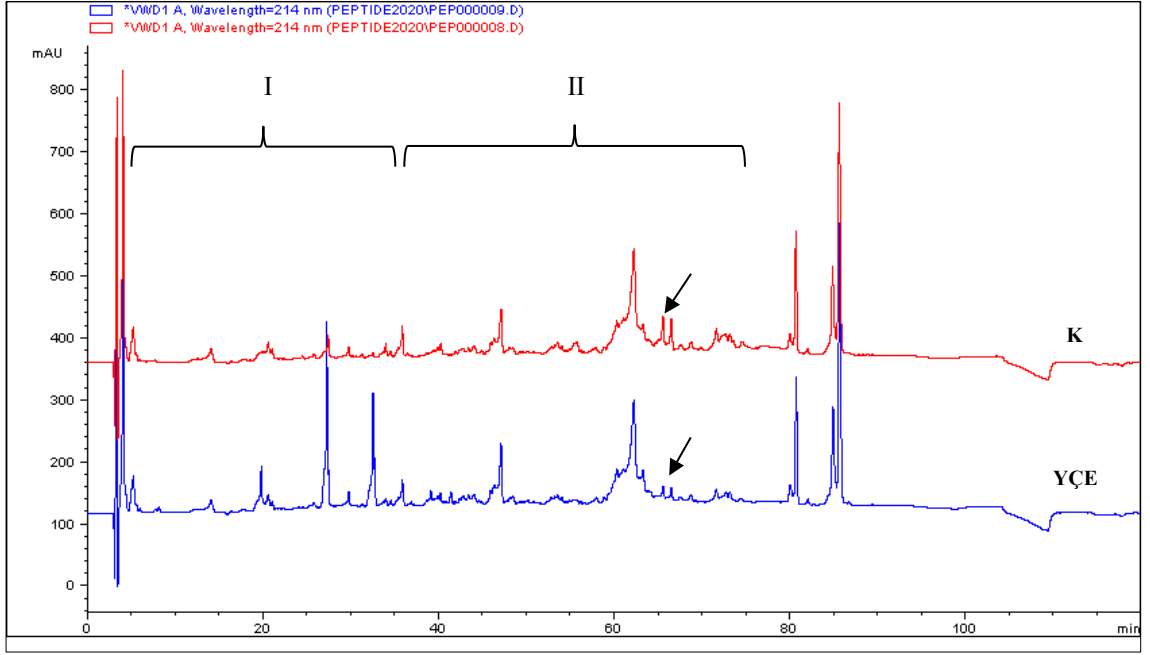
Şekil 4. 28. Olgunlaşma süreci boyunca (1., 15., 30., ve 60. günler) kontrol ve YÇE-peynire ait üre-PAGE elektroforetogramı (1 ve 10: Standart Na-kazeinat; 2,4,6,8: Kontrol peynir; 3,5,7,9: YÇE ilaveli peynir)

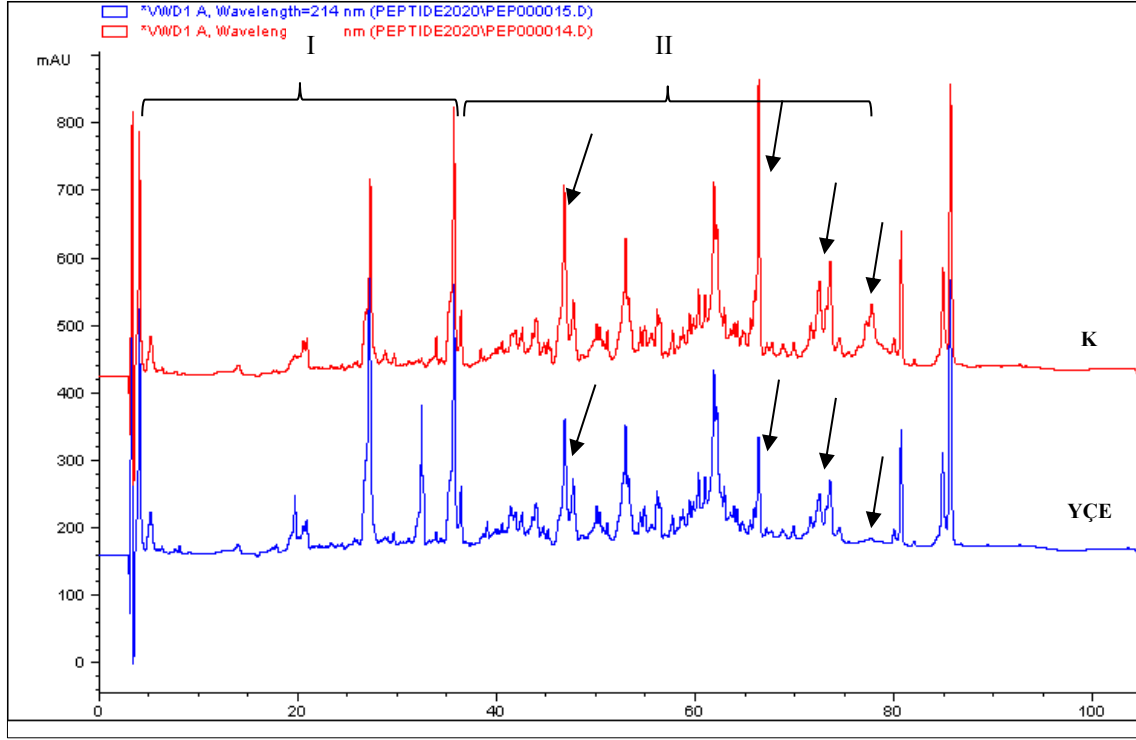
Örneklere β -kazein bantları incelendiğinde, olgunlaşma süreci boyunca bant genişliklerinde her iki peynir örneği için de önemli değişikliklerin olmadığı görülmektedir. β -kazeinin peynirin olgunlaşma süresince birincil olarak plazmin tarafından proteolize uğratıldığı bilinmektedir. Peynir örneklerine, yapım aşamasında plazmin enzimi ilave edilmiş olsa da, peynirin tuz içeriği ve sahip olduğu düşük pH

nedeni ile, örneklerde önemli düzeyde plazmin aktivitesi gerçekleşmediği düşünülmektedir. Olgunlaşma süreci boyunca γ -kazein fraksiyonlarında da önemli bir artış gözlenmemesi bu durumun bir sonucudur.

Sütün diğer temel kazein fraksiyonu olan α_{s1} -kazein bantları incelendiğinde ise, olgunlaşmanın 1.gününden itibaren α_{s1} -kazeinin parçalanarak proteoliz ürünlerinin oluştuğu görülmektedir. Ancak, proteoliz düzeyi 1. günde oldukça düşük olmakla birlikte, 15.günden itibaren α_{s1} -kazein bandında belirgin azalma; α_{s1} -I-kazein bandında ise belirgin artış gözlenmektedir. Olgunlaşmanın ilk gününde, α_{s1} -kazein bantları için kontrol ve YÇE-peynir örnekleri arasında belirgin fark görülmesi de, ilerleyen aşamalarda YÇE ilaveli peynirlerde α_{s1} -kazein hidrolizinin daha yavaş ilerlediği ve bu proteinin öncelikli olarak kimozen tarafından hidrolizi sonucu oluşan α_{s1} -I-kazein bantları genişliklerinin kontrol örneklere göre daha az düzeyde olduğu görülmektedir. Bu veriler, pH 4.6 çözünür azotlu madde analizi sonuçları ile de uyum içinde olup, YÇE ilavesinin, peynirlerin olgunlaşma süresinde, kalıntı kimozen aktivitesi üzerine olumsuz etki yarattığı sonucunu tekrarlamaktadır.

Elektroforetik analize ek olarak, YÇE ilavesinin peynirlerin olgunlaşma sürecinde gerçekleşen proteoliz sonucu oluşan peptit profilinde meydana getirebileceği olası değişimleri incelemek amacı ile pH 4.6'da çözünür fraksiyonların RP-HPLC profilleri incelenmiştir. pH 4.6'da çözünür azotlu maddelerin kromatogramları Şekil 4.29-31'de gösterilmiştir.





Şekil 4. 31. Kontrol (K) ve YÇE ilavesi ile üretilen minyatür peynirlerde (YÇE) olgunlaşmanın 60. gününde pH 4.6 çözümlü fraksiyona ait RP-HPLC kromatogramları

RP-HPLC analizinden elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, kromatogramlarda 80 ve 85. Dakikada elüe olan piklerin sıra ile α -laktalbumin ve β -laktoglobulin proteinlerine ait olduğu belirlenmiştir. Kromatogramlarda 'I' ile gösterilen bölge hidrofilik peptitler ve aminoasitlere karşılık gelirken, 'II' ile gösterilen bölge hidrofobik peptitleri temsil etmektedir [175]. Olgunlaşmanın başlangıcında, hidrofilik bölgedeki pik sayısı ve yoğunluğu oldukça düşük olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. İlerleyen olgunlaşma sürecinde, özellikle mikrobiyal proteazlar sayesinde orta büyüklükteki peptitlerin de yıkıma uğrayarak daha küçük boyuttaki peptitleri ve aminoasitleri açığa çıkardığı belirtilmiştir [176]. Peynir örneklerinde 15.güne ait RP-HPLC kromatogramlarının da bu durumu destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Ancak YÇE ilaveli peynir örneklerine ait kromatogramlarda belirgin olarak görülen ve yaklaşık 27. ve 32. dakikalarda elüe olan piklerin YÇE kateşinlerine ya da kateşinlerin degradasyonu veya oksidasyonu ile oluşan bileşiklere ait olabileceği düşünülmektedir. Kazeinlerin kalıntı rennet ve plazmin tarafından proteolize uğraması ile oluşan orta büyüklükteki peptitlerin yoğun olarak 'II' bölgesinde bulunması muhtemeldir. Bu nedenle peptit profilindeki farklılıkları belirlerken temel olarak bu bölgedeki peptit sayısı/yüksekliği baz

alınmıştır. Olgunlaşmanın 15. gününe ait kromatogramlar incelendiğinde, bu bölgede oldukça az sayıda peptit oluşumu gözlenmiş ve bu peptitlerden hidrofobik karakterde olanların bir kısmının (işaretli) kontrol örneklerde daha yüksek derişimde olduğu belirlenmiştir. Peptit sayılarında 30.gün ve 60. gün arasında önemli fark bulunmazken, pik yükseklikleri olgunlaşma sürecinde artış göstermiştir. Olgunlaşmanın 30. gününe ait kromatogramlarda kazeinlerin proteolizi sonucu oluşan ürünleri heterojen karışımına işaret eden birçok pik izlenmiş ve hidrofobik bölgedeki peptitlere ait piklerden bir kısmının kontrol örneklerde, YÇE ilave edilen peynir örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, olgunlaşmanın 60. gününde de hidrofobik bölgedeki işaretli peptitlerin yüksekliklerinin kontrol örneklerde daha fazla olduğu görülmektedir. α_{s1} -kazein ve β -kazeinin hidroliz ürünleri olan peptitlerden bazılarının YÇE ilave edilmiş örneklerde kontrol örneklere göre daha düşük derişimde olması, pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler ve üre-PAGE analizleri ile elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir. YÇE ilaveli peynirlerde kontrol peynirlere göre ilave peptit pikleri olmaması, buna karşın pik yüksekliklerinin değişiklik göstermesi, YÇE ilavesinin olgunlaşma sürecinde proteoliz paternini değiştirmese de hızını yavaşlattığı düşüncesini doğurmuştur. Olgunlaşma sürecinde elde edilen enzim aktivitesi değerleri ile birlikte düşünüldüğünde, pH 4.6 çözünür fraksiyonlarda belirlenen ve YÇE ilaveli peynirlerde kontrol örneklere kıyasla daha düşük seviyede bulunan peptitlerin daha çok α_{s1} -kazeinin hidroliz ürünleri olması beklenmektedir. Ancak bu olgunun doğrulanabilmesi için pik tanımlanması yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Mevcut tez çalışması kapsamında, süt endüstrisi için iki önemli proteaz olan kimozin ve plazmin enzimlerine karşı fenolik bileşiklerin inhibisyon özellikleri incelenerek, hem moleküler düzeyde bağlanma durumlarının belirlenmesi; hem de sağlık üzerine etkileri birçok epidemiyolojik çalışma ile kanıtlanmış biyoaktif bileşiklerin peynir yapımında kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, saf haldeki fenolik bileşikler ile model (tampon çözelti) sistemlerde ve süt matrisinde inhibisyon denemeleri yapılmış ve analiz edilen 10 adet fenolik bileşikten ECG, EGCG, QUER, MYR ve CURC'in plazmini model sistemlerde büyük ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, inhibisyon denemeleri süt proteinlerinin varlığında yürütüldüğünde, bu bileşiklerin plazmini inhibe etme yeteneklerinin daha düşük seviyede olduğu görülse de, hala önemli oranda inhibisyona yol açtıkları belirlenmiştir.

Yürütülen kinetik çalışmalar sonucunda gözlemlenen benzer K_m^{app} değerleri ile azalan V_{max}^{app} değerleri EGCG, QUER ve MYR'in yarışmasız olarak plazmini inhibe ettiğini; azalan K_m^{app} ve V_{max}^{app} değerleri ise ECG ve CURC'in plazmine karşı karışık tip inhibisyona yol açtığını göstermiştir.

Fenolik bileşikler tarafından gerçekleştirilen plazmin inhibisyonunun mekanizmasının aydınlatılması amacı ile çalışmada kullanılan tüm fenolik bileşikler ile plazminin etkileşimi sonrası oluşan komplekslerin ikincil yapısı incelenmiştir. İnhibitör özellik gösteren bileşikler ile etkileşimin plazminin konformasyonda değişimlere neden olduğu ve enzimin native halde sahip olduğu yüksek düzeydeki düzensiz yapıların, daha düzenli yapılara doğru evrilmesine yol açtığı belirlenmiştir. ITC denemelerinden elde edilen negatif entalpi (ΔH) ve yine negatif ancak daha düşük entropi (ΔS) değerleri, plazminin ikincil yapısında değişikliğe yol açan etkileşimlerin öncelikli olarak hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler olduğunu, ancak hidrofobik etkileşimlerin ile de yapının stabilizasyonunda rol aldığını göstermiştir. Fenolik bileşiklerin moleküler farklılıkları ile bağlanma karakteristikleri incelendiğinde; QUER'e göre daha yüksek bağlanma katsayısı ve düşük IC_{50} değerine sahip olan MYR'in B halkasındaki ekstra -OH grubunun bağlanmayı ve inhibisyonu güçlendirdiği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, EGCG'in

B halkasında bulunan -OH grubunun da inhibisyon özelliklerini artırıcı etkisi olduğu ve de kateşinlerin inhibitör özellik göstermesinde yapıdaki galloyl grubunun kilit rol oynadığı da düşünülmektedir.

Kimozin enzimi ile model sistemlerde yürütülen inhibisyon çalışmalarından elde edilen bulgular ise çalışmada kullanılan flavonoidler ya da fenolik asitlerden hiçbirinin enzimin yapay substratı üzerindeki aktivitesine istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Literatürde kimoziinden başka aspartik proteazların bazı fenoliklerce inhibisyonu belirtilmişse de, kimoziinin görece korunaklı aktif bölgesinin olası etkileşimlerden etkilenmediği düşünülmektedir. Kimozin ve kimoziin-fenolik komplekslerinin incelendiği CD çalışmaları sonucu elde edilen bulgular da, çalışmada kullanılan hiçbir fenolik bileşiğin kimoziinin ikincil yapısında önemli bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir. İTK denemeleri de kimoziin ile fenolik bileşikler arasındaki etkileşimler sonucu açığa çıkan ısının, fenoliklerin seyrleme ısısından önemli oranda farklı olmadığı yapılan denemeler sırasında izlenmiş ve bu nedenle fenoliklerin kimoziin ile olası etkileşimlerinin termodinamik olarak değerlendirilmesi yapılamamıştır. Bu durum, fenolik bileşiklerin kimoziin ile etkin bir şekilde etkileşime girmeme ihtimalini düşündürmüştür.

İki farklı proteaz alt grubuna ait enzimler olan plazmin ve kimoziin ile yapılan model sistem çalışmaları, fenolik bileşikler ile enzimler arasındaki etkileşimlerde enzim yapısı, büyüklüğü ve konformasyonunun büyük önem taşıdığını göstermiştir.

Fenolik bileşiklerin peynir yapımı ve olgunlaşması aşamasında proteolitik enzimlerin (plazmin ve kimoziin) aktivitelerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, yeşil çay ekstraktının (YÇE) kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak rennet (kimoziin) ile koagülasyon denemeleri yürütülmüş ve YÇE ilavesi ile rennetlenmenin ilk aşaması olan enzimatik fazın olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Enzimatik fazda kimoziinin κ -kazeine spesifik hidrolizi sonrası oluşan kazeinomakropeptit (CMP) oluşum hızının YÇE ilavesi ile konsantrasyona bağımlı biçimde azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Buna karşın, kontrol ve YÇE ilaveli süt örneklerinde, 120 dakikalık rennet ile koagülasyon sürecinin sonunda proteolize uğrayan κ -kazein derişimleri arasında önemli fark bulunmamıştır. Rennet ile koagülasyonun ilk aşamasındaki sözü geçen inhibisyonun, kimoziin ve YÇE fenolikleri arasındaki moleküler etkileşimlerden kaynaklanmadığı; kazeinler ile interaksiyona giren

fenolik bileşiklerin sterik bir engel oluşturarak, kimoziin tarafından κ -kazeinin hidrolizinin engellenmiş olabileceği düşünölmektedir. Kimoziine karşı doğrudan, konformasyon değişimi yolu ile, inhibisyona yol açmayan fenolik bileşiklerin, kazeinler ile etkileşim sonrası dolaylı bir inhibisyona neden olmuş olabileceği tartışılmıştır. Yürütölen DLS analizleri sonucunda ise, rennet ile koagölasyonun ikinci aşaması olarak kabul edilen flokülasyon (sıkılaşıma) aşamasında, kazein misellerinin biraraya gelme sürecinin YÇE ilavesi ile yavaşladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak zengin kateşin içeriğine sahip YÇE'nin, sütün rennet ile koagölasyonunda hem enzimatik faz hem de flokülasyon fazını yavaşlattığı bulunmuştur.

Tez çalışmasının son aşamasında laboratuvar ölçekli minyatür peynir üretimi gerçekleştirilmiş ve 60 günlük olgunlaşma süreci boyunca peynirde kalıntı kimoziin ve plazmin enzimlerin aktivitesi ve bu enzimlerden kaynaklı proteoliz düzeylerine YÇE ilavesinin etkisi belirlenmiştir. Peynirde analiz edilebilir düzeyde plazmin seviyesini yakalayabilmek amacıyla peynir yapım aşamasında süte plazmin enzimi dışarıdan ilave edilmiştir. İlginç biçimde, olgunlaşma süreci boyunca elde edilen plazmin ve kimoziin aktivitesi değerlerine YÇE fenoliklerinin etkisinin model sistemler ile elde edilen sonuçlar ile örtüşmediği gözlemlenmiştir. Minyatür peynir örneklerinde plazmin aktivitesinin olgunlaşma süresi boyunca YÇE ilavesinden etkilenmediği, buna karşın kalıntı kimoziin aktivitesinin YÇE ilavesi ile üretilen peynirlerde kontrol peynirlere göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir.

Peynirin olgunlaşma sürecinde en önemli kimyasal süreçlerden olan proteoliz, pH 4.6'da çözünür toplam azotlu madde miktarı ile incelendiğinde; çoğunlukla kalıntı kimoziin ve daha az düzeyde plazminden kaynaklı olduğu bilinen birincil proteolizin, YÇE ilaveli örneklerde daha yavaş ilerlediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, olgunlaşma süresi boyunca alınan örneklere ait üre-PAGE elektroforetogramları da kimoziinin birincil substratı olan α_{s1} -kazeinin hidrolizinin YÇE'li peynirlerde kontrol örneklere kıyasla daha yavaş ilerlediğini göstermiştir. Plazminin sütteki birincil substratı olan β -kazein derişimlerinde ise olgunlaşma süresi ve YÇE ilavesinin etkisinin önemsiz düzeyde olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$). Olgunlaşma sürecinde minyatür peynir örneklerine ait pH 4.6'da çözünür azot fraksiyonlarının incelendiği RP-HPLC sonuçlarına göre, olgunlaşmanın 30. ve 60. günlerinde YÇE ilaveli peynirlerde peptit profilinin kontrol peynirler ile benzer

olduđu belirlenmiř, ancak oluřan peptitlerin bir kısmının miktarının daha dűřűk olduđu gűzlemlenmiřtir. Peynir űrneklerinde olgunlařma sűrecinde gerűekleřen proteoliz bűtűnűyle deđerlendirildiđinde, yeřil űay fenoliklerinin plazmin ya da kimozinin proteolitik yolları űzerinde bir etkisi olmasa da űzellikle kazeinler ile etkileřim sonucu proteolitik aktivitenin yavařladıđı sonucuna ulařılmıřtır.

Mevcut tez űalıřması ile sűtte plazmin inhibisyonuna yol aűabilecek fenolik bileřikler belirlenmiř ve sűtte plazmin kaynaklı teknolojik kusurları űnlemede alternatif olarak kullanılabileređi tartıřılmıřtır. Peynir yapımı ařamasında fenolik bileřiklerin, kazeinler ile etkileřimi sonrası rennetlenme sűrecini yavařlattıđı belirlenmiřtir. Bunun yanı sıra, model sistemlerde incelenen proteaz inhibisyonunun, űok daha kopleks ve dinamik bir yapı olan peynir matrisi iűinde deđerriřim gűsterebileceđi belirlenmiřtir. Elde edilen veriler ile, fonksiyonel sűt űrűnleri űretiminde teknolojik parametrelerin ve űrűn űzelliklerinin deđerlendirilmesinde, fenolik bileřikler ile proteinler arasındaki etkileřimlerinin yanı sıra, sűtűn minűr bileřenleri olan ve birűok sűreűte kilit rol oynayan enzimler ile de etkileřimlerinin belirlenmesinin űnemi ortaya konmuřtur.

6. KAYNAKLAR

- [1] A.L. Kelly, J. Foley, Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count, *International Dairy Journal*, 7, 1997.
- [2] D.F. Newstead, G. Paterson, S.G. Anema, C.J. Coker, A.R. Wewala, Plasmin activity in direct-steam-injection UHT processed reconstituted milk: effects of preheat treatment, *International Dairy Journal* 16, 573–579, 2006.
- [3] P.F. Fox, Proteolysis during cheese manufacturing and ripening, *Journal of Dairy Science* 72, 1379–1400, 1989.
- [4] A.S. Precetti, M.P. Oria, S.S. Nielsen, Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system, *Journal of Dairy Science* 80, 1490–1496, 1997.
- [5] M. Richards, H.L. De Kock, K.G. Duodu, E.M. Buys, The effect of legume protease inhibitors on native milk and bacterial proteases. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 628–633, 2014.
- [6] N. Ersoz and F.C. Dudak, Development and characterisation of a novel peptide inhibitor of plasmin. *International Dairy Journal*, 71, 82–88, 2017.
- [7] S. Kumar and A.K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World Journal*, 2013, 1–16, 2013.
- [8] J.P. Spencer, C. Rice-Evans, R.J. Williams, Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 34783–34793, 2003.
- [9] G. Williamson, The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin* 42, 226–235, 2017.
- [10] D.L. Nelson, M. M. Cox, ve A. L. Lehninger, *Principles of biochemistry*. New York, Freeman, 2008.
- [11] D.C. Whitcomb, ve M.E. Lowe, Human pancreatic digestive enzymes, *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 1-17, 2007.
- [12] P.F. Fox ve A.L. Kelly, Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 1, *International Dairy Journal*, 16, 500-516, 2006.
- [13] B.A. Law, 2010. *Enzymes in dairy product manufacture*, *Enzymes in Food Technology* 2nd Edition. R.J. Whitehurst ve M. van Oort (Eds), USA: Wiley-Blackwell, 2010.
- [14] G.R. Beecher, Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake, *The Journal of Nutrition*, 133, 3248-3254, 2003.
- [15] R. Zamora-Ros, M. Rabassa, R. Llorach, C.A. Gonzales, Application of dietary phenolic biomarkers in epidemiology: past, present, future, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6648-665, 2012.

- [16] J. Perez-Jimenez, L. Fezeu, M. Touvier, N. Arnault, C. Manach, S. Hercberg, P. Galan, A. Scalbert, Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 1220-1228, 2011.
- [17] I.C. Arts, P.C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317-325, 2005.
- [18] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568, 2002.
- [19] L. Hooper, P.A. Kroon, E.B. Rimm, J.S. Cohn, L. Harvey, K.A. Le Cornu, J.J. Ryder, W.L. Hall, A. Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *American Journal of Clinical Nutrition*, 88,38-50, 2008
- [20] L. Wang, I.M. Lee, S.M. Zhang, J.B. Blumberg, J.E. Buring, H.D. Sesso, Dietary intake of selected flavonols, flavones and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 905-912, 2009.
- [21] J.M. Hodgson, K.D. Croft, Tea flavonoids and cardiovascular health, *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 495-502, 2010.
- [22] N. Khan, H. Mukhtar, Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519-533, 2007.
- [23] R.J. Moore, K.G. Jackson, Minihane, A.M. Green tea catechins and vascular function, *British Journal of Nutrition*, 102, 1790-1802, 2009.
- [24] J.P. Spencer, M.M. El Mohsen, A.M. Minihane, J.C. Mether, Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research, *British Journal of Nutrition*, 99, 12-22, 2008.
- [25] J. Perez-Jimenez, J. Hubert, A. Cassidy, C. Manach, G. Williamson, A. Scalbert, Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review, *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 801-809, 2010.
- [26] R. Zamora-Ros, M. Urpi-Sarda, R.M. Lamuela-Raventos, R. Estruch, M.A. Martinez-Gonzales, M. Bullo, F. Aros, A. Cherubini, C. Andres-Lacueva, Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects: The PREDIMED Study. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 1562-1566, 2009.
- [27] J.R. Marshall, Methodologic and statistical considerations regarding use of biomarkers of nutritional exposure in epidemiology, *The Journal of Nutrition*, 133, 881-887, 2003.
- [28] M. Naczki, F. Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in foods, *Journal of Chromatography A*. 1054, 95-111, 2004.
- [29] V. Cheynier, Polyphenols in foods are more complex than often thought, *Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223-229, 2005.
- [30] H. Halbwirth, The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pattern, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 595-621, 2010.

- [31] E. Lo Piparo, H. Scheib, N. Frei, G. Williamson, M. Grigorov, C.J. Chou, Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human alpha-amylase, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12), 3555-3561, 2008.
- [32] Y. Narita, K. Inouye, Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas alpha-amylase isozyme I, *Food Chemistry*, 127(4), 1532-1539, 2011.
- [33] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, 1996.
- [34] M.G. Hertog, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands, *Nutrition and Cancer*, 20, 21-29, 1993.
- [35] G.Y. Yang, Z. Liu, D.N. Seril, J. Liao, W. Ding, S. Kim, F. Bondoc, C.S. Yang, Black tea constituents, theaflavins, inhibit NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis*, 18, 2361-2365, 1997.
- [36] E.N. Frankel, J. Kanner, J.B. German, E. Parks, J.E. Kinsella, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet*, 341: 454-457, 1993.
- [37] I.C. Arts, P.C. Hollman, D. Kromhout, Chocolate as a source of tea flavonoids, *Lancet*, 354: 488, 1999.
- [38] H. Adlercreutz, W. Mazur, Photo-oestrogens and Western disease, *Annals of Medicine*, 29, 95-120, 1997.
- [39] S. Franklyn De Silva, J. Alcorn. Flaxseed Lignans as Important Dietary Polyphenols for Cancer Prevention and Treatment: Chemistry, Pharmacokinetics, and Molecular Targets. *Pharmaceuticals*, 12 (2), 2019.
- [40] M. Bouaziz, H. Jemai, W. Khabou, S. Sayadi, Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 90: 1750-1758, 2010.
- [41] A.M. Chuah, Y.C. Lee, T. Yamaguchi, H. Takamura, L.J. Yin, T. Matoba, Effect of cooking on the antioxidant properties of colored peppers, *Food Chemistry*, 111, 20-28, 2008.
- [42] M.K. Roy, L.R. Juneja, S. Isobe, T. Tsushida, Steam processed broccoli has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems, *Food Chemistry*, 114, 263-269, 2009.
- [43] L. Blonde, Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. *American Journal of Medical Sciences*, 343, 17-20, 2012.
- [44] M.C. Bohin, J.P. Vicken, H.T.W.M van der Hijden, H. Gruppen, Efficacy of food proteins as carriers for flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4136-4143, 2012.
- [45] U. Lewandowska, K. Szewczyk, E. Hrabec, A. Janecka, S. Gorlach, Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12183-12199, 2013

- [46] K.J. Siebert, N.V. Troukhanova, P.Y. Lynn, Nature of polyphenol-protein interactions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80-85, 1996.
- [47] S.V. Prigent, H. Gruppen, A. J. Visser, G.A.van Koningsveld, G.A. De Jong, A.G.Voragen, Effects of noncovalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5088-5095, 2003.
- [48] H.M. Rawel, K. Meidtner, J. Kroll, Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4228-4235, 2005.
- [49] T. White, Tannins-their occurrence and signifance, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 8, 377-385, 1957.
- [50] W.E. Artz, P.D. Bishop, A.K. Dunker, E.G. Schanus, B.G. Swanson, Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified bean globulin fraction G-1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 417-421, 1987.
- [51] V.D. Freitas, N. Mateus, Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 940-945, 2001.
- [52] J.P. McManus, K.G. Davies, J.E. Beart, S.H. Gaffney, T.H. Lilley, E. Haslam, Polyphenol interactions: some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*: 1429-1438, 1985.
- [53] N.J. Murray, M.P. Williamson, T.H. Lilley, E. Haslam, Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by H-NMR spectroscopy, *European Journal of Biochemistry*, 219, 923-935, 1994.
- [54] V. Aguié-Beghin, P. Sausse, E.Meudec, V. Cheynier, R. Douillard, Polyphenol-beta-casein complexes at the air/water interface and in solution: effects of polyphenol structure, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 9600-9611, 2008.
- [55] Y.D. Livney, Milk proteins as a vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 73-83, 2010.
- [56] C.D. Kanakis, I. Hasni, P. Bourassa, P.A. Trantilis, M.G. Polissiou, H.A. Tajmir-Riahi, Milk beta-lactoglobulin complexes with tea polyphenols, *Food Chemistry*, 127, 1046-1055, 2011.
- [57] N.J. Baxter, T.H. Lilley, E. Haslam, M.P. Williamson, Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation, *Biochemistry*, 36, 5566-5577, 1997.
- [58] A. Singh, S. Holvoet, A. Mercenier, Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases, *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 1346-1359, 2011.
- [59] S.Y. Chung, E.T. Champagne, Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds, *Food Chemistry*, 115, 1345-1349, 2009.
- [60] N.J. Plundrich, M. Kulis, B.L. White, M.H. Grace, R. Guo, A.W. Burks, , J.P. Davis, M.A. Lila, Novel strategy to create hypoallergenic peanut protein-

- polyphenol edible matrices for oral immunotherapy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7010-7021, 2014.
- [61] M. Perot, M. Lupi, S. Guyot, C. Delayre-Orthez, P. Gadonna-Widehem, J-Y. Thebaudin, M. Bodinier, C. Larre, Polyphenol interactions mitigate the immunogenicity and allergenicity of gliadins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65,31, 2017.
- [62] J. E. O'Connell, P.D. Fox, R. Tan-Kintia, P.F. Fox, Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk, *International Dairy Journal*, 689–693, 1998.
- [63] J. E. O'Connell, P.F. Fox, Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review, *International Dairy Journal*, 11:103- 120, 2001.
- [64] J. Han, M. Britten, D. St-Gelais, C.P. Champagne, P. Fustier, S. Salmieri, M. Lacroix, Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese, *Food Chemistry*, 124,1589-1594, 2011.
- [65] P. Jauregi, J.B. Olatujoye, I. Cabezudo, R.A. Fraizer, M.H. Gordon, Astringency reduction in red wine by whey proteins, *Food Chemistry*, 199,547-555, 2016
- [66] A.A. Moeiniafshari, A. Zarrabi, A.K. Bordbar, Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy, *Food Hydrocolloids*, 51, 1-6, 2015.
- [67] I. Hasni, P. Bourassa, S. Hamdani, G. Samson, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols, *Food Chemistry*, 126:630-639, 2011.
- [68] D. Roy, S. Dutta, S.S. Maity, S. Ghosh, A. Singha Roy, K.S. Ghosh, Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins, *Journal of Luminescence*, 132, 1364-1375, 2012.
- [69] L. Fu, Y. Sun, L. Ding, Y. Wang, Z. Gao, Z. Wu, Z. Wang, W. Li, Y. Bi, Mechanism evaluation of the interactions between flavonoids and bovine serum albumin based on multispectroscopy, molecular docking and Q-TOF HR-MS analysis, *Food Chemistry*, 203:150-157, 2016.
- [70] H. Cao, X. Jing, D. Wu, Y. Shi, Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins, *International Journal of Food Science and Nutrition* 64(4), 437-443, 2013.
- [71] M.C. Bohin, J.P. Vincken, A.H. Westphal, A.M. Tripp, P. Dekker, H.T.M.W. van der Hijden, H. Gruppen, Interaction of flavan-3-ol derivatives and different caseins is determined by more than proline content and number of proline repeats, *Food Chemistry*, 158:408-416, 2014.
- [72] D.P. Acharya, L. Sanguansri, M.A. Augustin, Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions, *Food Chemistry*, 141, 1050-1054, 2013.
- [73] A.H. Sneharani, J.V. Karakkat, S.A. Singh, A.G. Rao, Interaction of curcumin with blactoglobulin stability, Spectroscopic analysis and Molecular modeling of the complex, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 11130-11139, 2010.

- [74] Z. Yüksel, E. Avcı, Y.K. Erdem, Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins, *Food Chemistry*, 121:450-456, 2010.
- [75] H.M. Rawel, D. Czajka, S. Rohn, J. Kroll, Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins, *International Journal of Biological Macromolecules*, 30,3-4, 2002.
- [76] M.P. Almajano, M.E. Delgado, M.H. Gordon, Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate, *Food Chemistry*, 101,126-130, 2007.
- [77] A. Belscak, D. Komes, D. Horzic, K.K. Ganic, D. Karlovic, Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition, *Food Research International*, 42,707-716, 2009.
- [78] L. Ryan, S. Petit, Addition of whole, semiskimmed and skimmed bovine milk reduces the total antioxidant capacity of black tea, *Nutrition Research*, 30,14-20, 2010.
- [79] J.B. Keogh, J. McInerney, P.M. Clifton, The effect of milk protein on the bioavailability of milk polyphenols, *Journal of Food Science*, 72,230-233, 2007.
- [80] R. Leenen, A.J. Roodenburg, L.B. Tijburg, S.A. Wiseman, A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans, *European Journal of Clinical Nutrition*, 54,87-92, 2000.
- [81] G.S. Duarte, A. Farah, Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on CGAs' bioavailability in humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7925-7931, 2011.
- [82] M. Stojadinovic, J. Radosavljevic, J. Ognjenovic, J. Vesic, I. Prodic, D. Stanic-Vucinic, T. Cirkovic- Velickovic, Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed, *Food Chemistry* 136,1263-1271, 2013.
- [83] G.J. McDougall, N.N. Kulkarni, D. Stewart, Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes, *Biofactors*, 34, 73-80, 2008.
- [84] G.J. McDougall, D. Stewart, The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes, *Biofactors*, 23, 189-195, 2005.
- [85] Z. Tantoush, D. Apostovolic, B. Kravic, I. Prodic, L. Mihajlovic, D., Stanic-Vucinic, V.T. Cirkovic, Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion if oxidized by phenol oxidase. *Journal of Functional Foods*, 4, 650-660, 2012.
- [86] J. Sekiya, T. Kajiwara, T. Monma, A. Hutanaka, Interaction of tea catechins with proteins: formation of protein precipitates, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 1963-1967, 1984.
- [87] J.H. O'Keefe, M. Abuannadi, C.J. Lavie, D.S. Bell, Strategies for optimizing glycemic control and cardiovascular prognosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clinic Proceedings*, 86, 128-138, 2011.

- [88] M. Miao, H. Jiang, B. Jiang, T. Zhang, S.W. Cui, Z. Jin, Phytonutrients for controlling starch digestion: evaluation of grape skin extract, *Food Chemistry*, 145, 205-211, 2014.
- [89] D.A. Boggs, L. Rosenberg, E.A. Ruiz-Narvaez, J.R. Palmer, Coffee, tea, and alcohol intake in relation to risk of type 2 diabetes in African American women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 960-966, 2010.
- [90] W. Tang, S. Li, Y. Liu, M.T. Huang, C.T. Ho, Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in type 2 diabetes mice model via different mechanisms, *Journal of Functional Foods*, 5: 1784-1793, 2013.
- [91] J.R. Homoki, A. Nemes, E. Fazekas, G. Gyemant, P. Balogh, F. Gal, J. Al-Asri, J. Mortier, Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and alpha-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties, *Food Chemistry*, 194, 222-229, 2016.
- [92] F. Galvano, L. La Fauci, P. Vitaglione, V. Fogliano, L. Vanella, C. Felgines, Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides, *Ann.Ist. Super. Sanita*, 43, 382-393, 2007.
- [93] L. Kandra, G. Gyemant, A. Zajacz, C. Batta, Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase, *Biocemical and Biophysical Research Communications*, 319, 1265-1271, 2004.
- [94] S. Lordan, T.J. Smyth, A. Soler-Vila, C. Stanton, R.P. Ross, The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts, *Food Chemistry*, 141, 2170-2176, 2013.
- [95] H. Cao, X.Q. Chen, Structures required of flavonoids for inhibiting digestive enzymes. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 12, 929-939, 2012.
- [96] N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution, *Acta Crystallographia D-Biol. Cryst.* 52, 435-446, 1996.
- [97] R.B. Birari, K.K. Bhutani, Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential, *Drug Discovery Today*, 12, 879-889, 2007.
- [98] J.W. Yun, Possible antiobesity therapeutics from nature-a review. *Phytochemistry*, 71, 1625-1641, 2010.
- [99] M. Nakai, Y., Fukui, S. Asami, Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4593-4598, 2005.
- [100] T. Sergent, J. Vanderstraeten, J. Winand, Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances, *Food Chemistry*, 135, 68-73, 2012.
- [101] M.T. Gatto, S. Falcochio, E. Grippa, Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 269-272, 2002.
- [102] I. Bousova, L. Skalova, P. Soucek, P. Matouskova, The metabolism of carbonyl reductase 1 by polyphenols, *Drug Metabolism Reviews*, 47, 520-533, 2015.

- [103] C. Liu, F. Cheng, X. Yang, Inactivation of soybean trypsin inhibitor by epigallocatechin gallate: stopped-flow/fluorescence, thermodynamics, and docking studies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 921-929, 2017.
- [104] S. Naz, R. Siddiqi, T.P. Dew, G. Williamson, Epigallocatechin-3-gallate inhibits lactase but it alleviated by salivary proline-rich proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2734-2738, 2011.
- [105] B. F. Ozen, K. D. Hayes, and L. J. Mauer, Measurement of plasminogen concentration and differentiation of plasmin and plasminogen using Fourier-transform infrared spectroscopy, *International Dairy Journal*, 13,441–446, 2003.
- [106] B. Ismail, S. S. Nielsen, Invited review: plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry, *Journal of dairy science*, 93,11,4999-5009, 2010.
- [107] I. Politis, D. M. Barbano, R. C. Gorewit, Distribution of Plasminogen and Plasmin in Fractions of Bovine Milk, *Journal of Dairy Science*, 75, 1402-1410, 1992.
- [108] S. Christensen, T. Wieggers, J. Hermansen, L. Sottrup-Jensen, Plasma-derived protease inhibitors in bovine milk, *International Dairy Journal*, 5, 439-449, 1995.
- [109] L. Hedstrom, Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chemical Reviews*, 102, 4501-4524, 2002.
- [110] A. Crudden, J. C. Oliveira, A. L. Kelly, Kinetic studies of the thermal inactivation of plasmin in acid or sweet whey, *International Dairy Journal*, 15, 1245-1253, 2005.
- [111] W. N. Eigel, J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrell, V. R. Harwalkar, R. Jenness, R. M. Whitney, Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision, *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631,1984.
- [112] E. D. Bastian, R. J. Brown, Plasmin in milk and dairy products: an update, *International Dairy Journal*, 6, 435-457, 1996.
- [113] V.M. Rauh, L.B. Johansen, R. Ipsen, M.Paulsson, L.B. Larsen, M.Hammershoj, Plasmin activity in UHT milk: relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 28, 6852-6860, 2014.
- [114] T. K. Dalsgaard, J. H. Nielsen, L. B. Larsen, Proteolysis of milk proteins lactosylated in model systems, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 404-414, 2007.
- [115] A. L. Kelly, P. L. H. McSweeney, Indigenous Proteinases in Milk. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 495-521): Springer US, 2003.
- [116] A. Crudden, P. F. Fox, A. L. Kelly, Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk, *International Dairy Journal*, 15,305–313, 2005.
- [117] J. Somers, A. Kelly, Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature, *Lait* 82, 181–191, 2002.
- [118] B. M. Prado, S. E. Sombers, B. Ismail, K. D. Hayes, Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk, *International Dairy Journal*, 16, 593-599, 2006.

- [119] C. N. Burbrink, K. D. Hayes, Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen, *International Dairy Journal*, 16, 580-585, 2006.
- [120] L. Iucci, R. Lanciotti, A. Kelly, T. Huppertz, Plasmin activity in high-pressure homogenised bovine milk, *Milchwissenschaft*, 63, 68-70, 2008.
- [121] N. Y. Farkye, P. F. Fox, Observations on plasmin activity in cheese, *Journal of Dairy Research*, 57, 3, 1990.
- [122] P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. H. McSweeney, *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, 2000.
- [123] I.P.O. Farrell, J.J. Sheehan, M.G. Wilkinson, D. Harrington, A.L. Kelly, Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese, *Lait*, 82,305-316, 2002.
- [124] O. Mara, C.Roupie, A.Duffy, A.L. Kelly, The curd-forming properties of milk as affected by the action of plasmin, *International Dairy Journal* , 8, 9 807-812, 1998.
- [125] M. Srinivasan, J.A. Lucey, Effects of plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels, *Journal of Dairy Science*, 85,1070–1078, 2002.
- [126] E. D. Bastian, R. J. Brown, C. A. Ernstrom. Plasmin activity and milk coagulation, *Journal of Dairy Science*, 74, 3677–3685, 1991.
- [127] A. K. Mohanty, U.K. Mukhopadhyay, S. Grover, V.K. Batish, Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture, *Biotechnology Advances*, 17,2-3, 205-217, 1999.
- [128] D.E. Danley, K.F. Geoghegan, Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 9785–9789, 1988.
- [129] G.L. Gilliland, E.L. Winborne, J. Nachman, A. Wlodawer, The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 8,1, 82-101, 1990.
- [130] V.E. Bines, P. Young, B.A. Law, Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet, *Journal of Dairy Research*, 56,4, 657-664, 1989.
- [131] F.P. Fox, P.L.H. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*, 3. Edition, Kluwer Academic- Plenum Publishers, New York, 2003.
- [132] E. Gustchina, L. Rumsh, L. Ginodman, P. Majer, N. Andreeva, Post X-ray crystallographic studies of chymosin: the existence of two structural forms and the regulation of activity by the interaction with the histidine-proline cluster of kappa-casein, *FEBS Lett*, 379, 60–62, 1996.
- [133] D.G. Dalgeish, Measurement of electrophoretic mobilities and zeta potentials of particles from milk using laser doppler electrophoresis, *Journal of Dairy Research*, 51, 425-438, 1984.
- [134] P.L.H. McSweeney, M.J. Sousa, Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheeses During Ripening, A review, *Lait*, 80, 293-324, 2000.

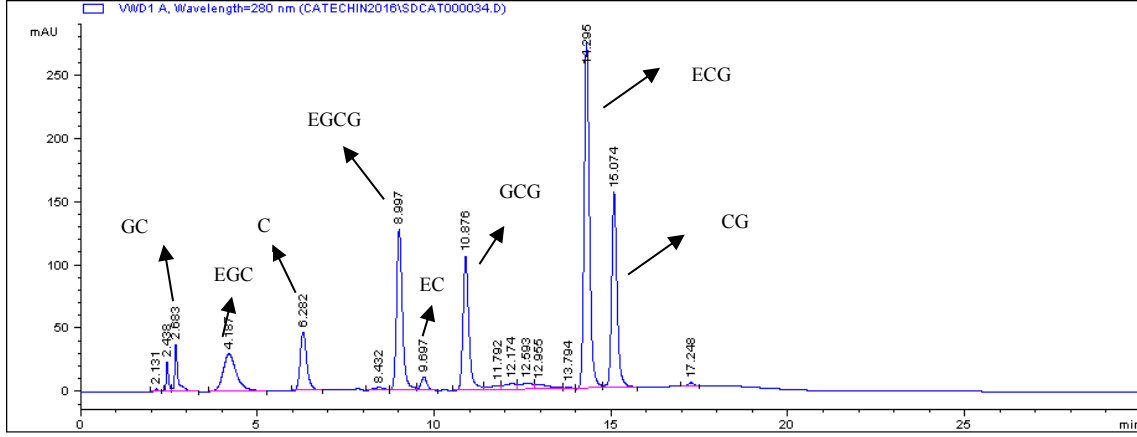
- [135] P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International*, 12, 4 , 457-509, 1996.
- [136] N. Bansal, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, Factors Affecting the Retention of Rennet in Cheese Curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9219–9225, 2007.
- [137] P. Garnot, D. Molle, M. Piot, Influence of pH, type of enzyme and ultrafiltration on the retention of milk clotting enzymes in Camembert cheese, *Journal of Dairy Research*, 54, 315–320, 1987.
- [138] C. Benfeldt, Ultrafiltration of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 16, 600-608, 2006.
- [139] B.C. Richardson, K.N.Pearce, The determination of plasmin in dairy products, *New Zeland Journal of Dairy Science and Technology*, 16,209–220, 1981.
- [140] P. Martin, J. C. Collin, P. Garnot, B. R. Dumas, G. Mocquot, Evaluation of bovine rennets in terms of absolute concentrations of chymosin and pepsin A, *Journal of Dairy Research*, 48,3, 447-456, 1981.
- [141] C. Thomä, I. Krause, U. Kulozik, Precipitation behaviour of caseinomacropetides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC, *International Dairy Journal*, 16,285–293, 2006.
- [142] IDF (1982) Milk and milk products—determination of total solids content. Int Stand FIL-IDF 21A:1982
- [143] IDF (1981) Determination of fat contents, gerber butyrometers. Int Stand FIL-IDF 105:1981
- [144] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254, 1976
- [145] M. J. Hurley, B. M. O'Driscoll, A.L. Kelly, P. L. H. McSweeney, Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese, *International Dairy Journal*, 9, 555-558, 1999.
- [146] Y. Ardö, A. Polychroniadou, *Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese*. COST 95, Luxembourg. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1999.
- [147] International Dairy Federation, Milk. Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content, IDF Standard 20B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1993.
- [148] C.N. Kuchroo, P.F. Fox, Fractionation of the water soluble nitrogen from cheddar cheese:chemical methods, *Milchwissenschaft*, 37, 651-653, 1982.
- [149] G. Xue, L. Gong, C. Yuan, M. Xu, X. Wang, L. Jiang, Structural mechanism of flavonoids in inhibiting serine proteases, *Food and Function*, 8, 2437–2443, 2017.
- [150] M. Cuccioloni, M. Mozzicafreddo, L. Bonfili, V. Cekarini, A.M. Eleuteri, M. Angeletti, Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases, *Chemical Biology & Drug Design*, 74, 1–15, 2009.

- [151] M. Bijak, R. Ziewiecki, J. Saluk, M. Ponczek, I. Pawlaczyk, H. Krotkiewski, Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds, *Medicinal Chemistry Research*, 23, 2324–2337, 2014.
- [152] L. Sun, F.J. Warren, G. Netzel, M.J. Gidley, 3 or 3'-Galloyl substitution plays an important role in association of catechins and theaflavins with porcine pancreatic α -amylase: the kinetics of inhibition of α -amylase by tea polyphenols, *Journal of Functional Foods*, 26, 144–156, 2016.
- [153] Y.Q. Li, P. Yang, G. Fei, Z.W. Zhang, B. Wu, Probing the interaction between 3 flavonoids and pancreatic lipase by methods of fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics, *European Food Research and Technology*, 233, 63–69, 2011.
- [154] X. Yang, F. Kong, Effects of tea polyphenols and different teas on pancreatic α -amylase activity in vitro, *LWT-Food Science and Technology*, 66, 232–238, 2016.
- [155] I. Sjöholm, B. Wiman, P. Wallan, Studies on the conformational changes of plasminogen induced during activation to plasmin and by 6-aminohexanoic acid, *European Journal of Biochemistry*, 39, 471–479, 1973.
- [156] X. Wu, H. Wu, M. Liu, Z. Liu, H. Xu, F. Lai, Analysis of binding interaction between (–) epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectrosc*, 82, 164–168 2011.
- [157] A.A. Metwalli, H.H. de Jongh, M.A. van Boekel, Heat inactivation of bovine plasmin, *International Dairy Journal*, 8, 47–56, 1998.
- [158] H. J. Zeng, R. Yang, H. Liang, L. B. Qu, Molecular interactions of flavonoids to pepsin: Insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 576-590, 2015.
- [159] X. Wu, W. Wang, T. Zhu, T. Liang, F. Lu, W. He, Z. He, Z. Liu, S. He, K. Gao, Z. He, Phenylpropanoid glycoside inhibition of pepsin, trypsin and α -chymotrypsin enzyme activity in Kudingcha leaves from *Ligustrum purpurascens*, *Food research international*, 54, 2, 1376-1382, 2013.
- [160] D. Tagliacuzzi, E. Verzelloni, A. Conte, Effect of some phenolic compounds and beverages on pepsin activity during simulated gastric digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8706-8713, 2005.
- [161] S. Yegin, P. Dekker, Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering, *Dairy Science & Technology*, 93, 6, 565–594, 2013.
- [162] S. Haratifar, M. Corredig, Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality, *Food Chemistry*, 143, 27-32, 2014.
- [163] De Kruif, C. G., Holt, C., Casein micelle structure, functions and interactions." *Advanced dairy chemistry—1 proteins*. Springer, Boston, MA, 2003. 233-276.
- [164] Gruppen, H., Interaction of flavan-3-ol derivatives and different caseins is determined by more than proline content and number of proline repeats, *Food Chemistry*, 158, 408- 416, 2014.

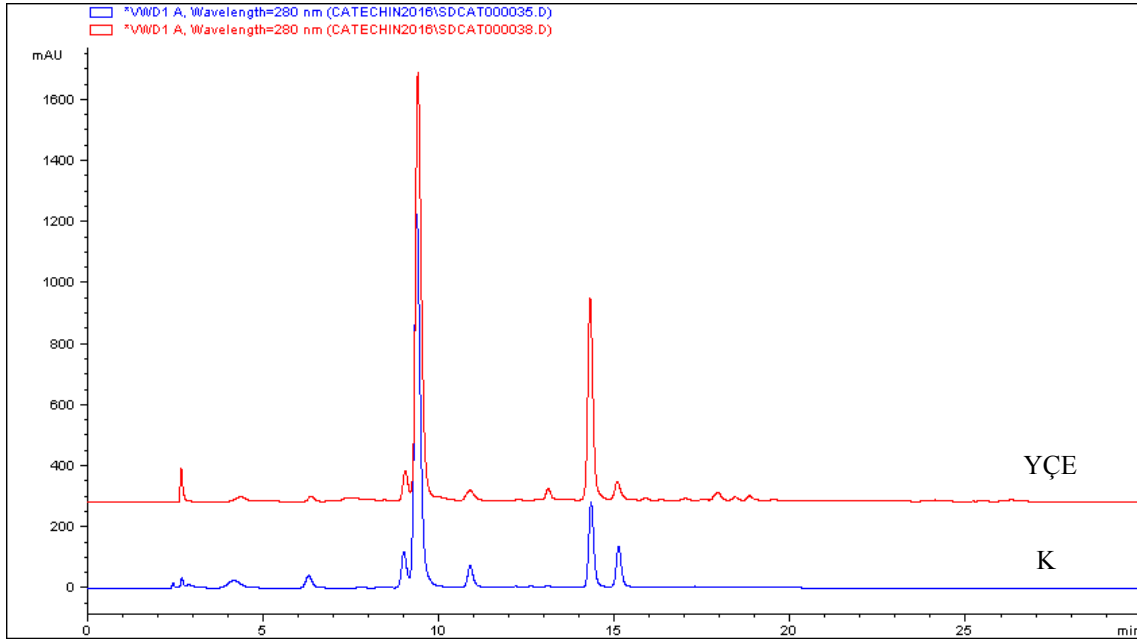
- [165] Malekhosseini, P, Alami, M., Khomeiri, M, Esteghlal, S., Nekoei, A.R., Hosseini, S.M.H., Development of casein-based nanoencapsulation systems for delivery of epigallocatechin gallate and folic acid, *Food Science and Nutrition*, 7,2, 519-527, 2019.
- [166] Dwyer, C., Donnelly, L., Buckin, V., Ultrasonic analysis of rennet-induced pregelation and gelation processes in milk, *Journal of Dairy Research*, 72, 303-310, 2005.
- [167] Freitas, C. D., Silva, M. Z., Oliveira, J. P., Silva, A. F., Ramos, M. V., de Sousa, J. S., Study of milk coagulation induced by chymosin using atomic force microscopy, *Food Bioscience*, 29, 81-85, 2019.
- [168] Patel, A. R., Seijen-ten-Hoorn, J., & Velikov, K. P., Colloidal complexes from associated water soluble cellulose derivative (methylcellulose) and green tea polyphenol (Epigallocatechin gallate), *Journal of Colloid and Interface Science*, 364 (2), 317-323, 2011.
- [169] H. J. Giroux, G. D. Grandpré, P. Fustier, C. P. Champagne, D. St-Gelais, M. Lacroix, M. Britten, Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract, *Dairy Science and Technology*, 93, 241–254, 2013.
- [170] D. F. da Silva, P. T. Matumoto-Pintro, L. Bazinet, C. Couillard, M. Britten, Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 3,1552-1562, 2015.
- [171] Vélez, M. A., Bergamini, C. V., Ramonda, M. B., Candiotti, M. C., Hynes, E. R., & Perotti, M. C., Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis, *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 282-288, 2015.
- [172] Bastian, E. D., Lo, C. G., David, K. M. M., Plasminogen activation in cheese milk: Influence on Swiss cheese ripening, *Journal of Dairy Science*, 80(2), 245-251, 1997.
- [173] Benfeldt, C., Sørensen, J., Ellegård, K. H., & Petersen, T. E., Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 7(11), 723-731, 1997.
- [174] Cesarman-Maus, G., Hajjar, K. A., Molecular mechanisms of fibrinolysis, *British journal of haematology*, 129(3), 307-321, 2005.
- [175] A. Michaelidou, M. C. Katsiari, E. Kondyli, L.P. Voutsinas & E. Alichanidis, Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Dairy Journal*, 13, 2-3, 179-189, 2003.
- [176] C. Benfeldt, C. & J. Sørensen, Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 567-574, 2001.

EKLER

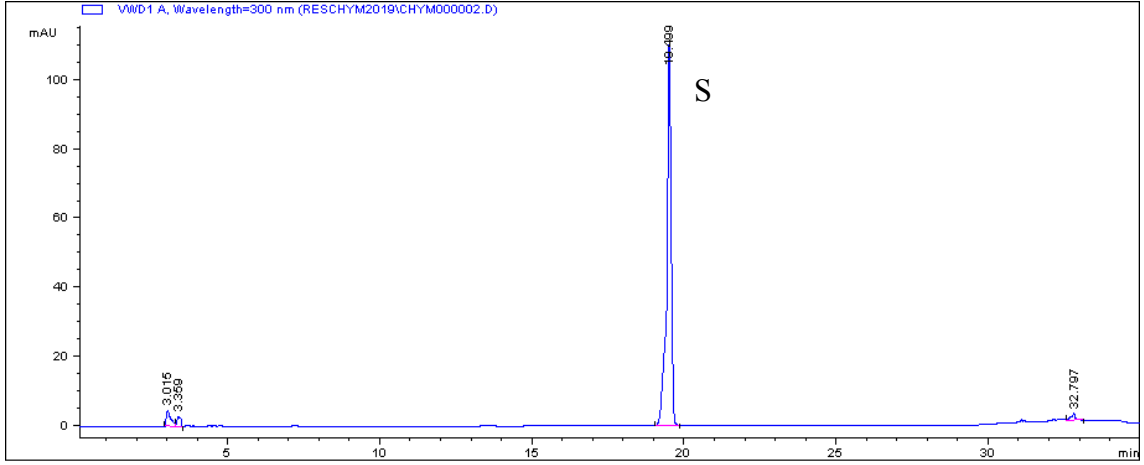
EK 1- RP-HPLC KRAMOTOGRAMLARI



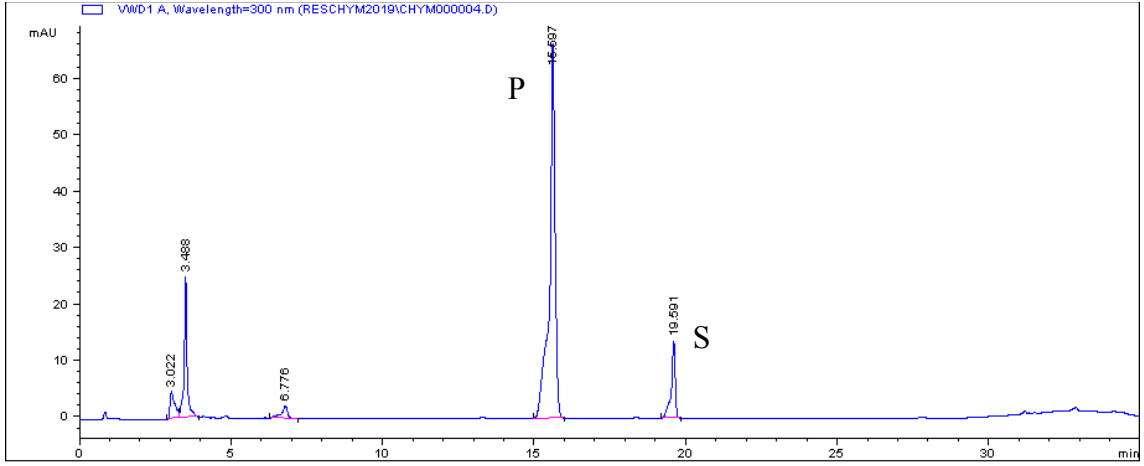
Şekil Ek 1. Saflaştırılmış fenolikler ile elde edilen kateşin karışımına ait RP-HPLC kromatogramı (C: kateşin, EC: epikateşin, ECG: epikateşin gallat, EGCG: epigallokateşin gallat, CG: kateşin gallat, GC: gallokateşin, EGC: epigallokateşin, GCG: gallokateşin gallat)



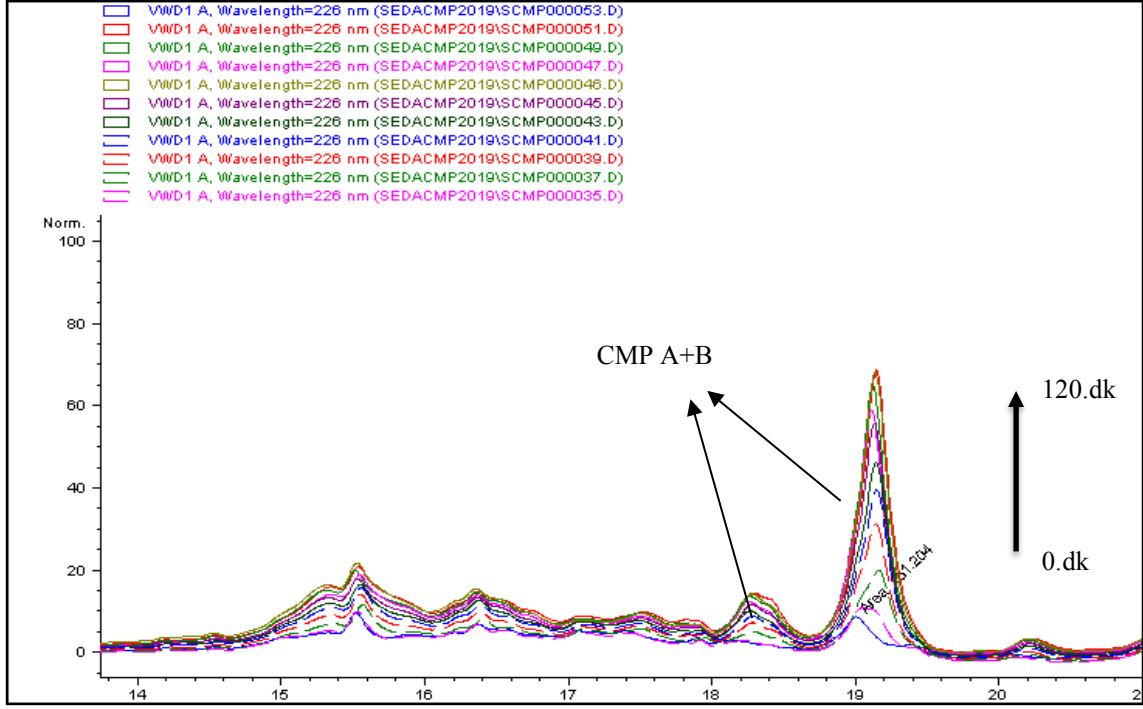
Şekil Ek 2. Saflaştırılmış fenolikler ile elde edilen kateşin karışımına (K) ve denemelerde kullanılan yeşil çay ekstraktına (YÇE) ait RP-HPLC kromatogramları



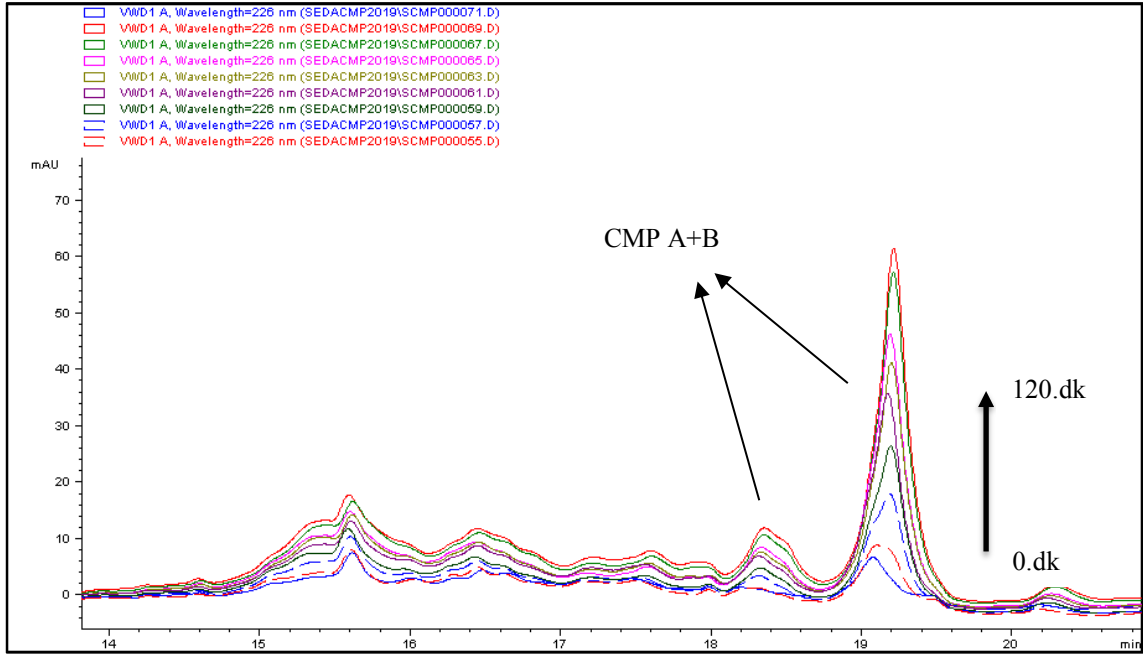
Şekil Ek 3. Kalıntı kimozin analizinde kullanılan substrata ait RP-HPLC kromatogramı (S: substrat)



Şekil Ek 4. Kalıntı kimozin analizinde kullanılan substratın kimozin ile etkileştirildikten sonraki karışıma ait RP-HPLC kromatogramı (S: substrat, P: ürün)



Şekil Ek 5. Kontrol peynir örneklerinde 120 dakikalık rennetlenme sürecinde belli zaman aralıklarında alınan örneklere ait kromatogramlar



Şekil Ek 6. YÇE ilaveli peynir örneklerinde 120 dakikalık rennetlenme sürecinde belli zaman aralıklarında alınan örneklere ait kromatogramlar

