

**BAZI ENTEROCOCCUS TÜRLERİNİN SÜTTE BİYOAKTİF PEPTİD
ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ**

FETHİ SEYHAN

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALINDA
YÜKSEK LİSANS
DERECESİ İÇİN GEREKLİ ÇALIŞMALARI YERİNE GETİREREK
ONAYA SUNULAN TEZ**

NİSAN 2012

Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Onayı

Prof. Dr. Nihat ÇELEBİ
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak gerekli çalışmaları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Barbaros ÖZER
Anabilim Dalı Başkanı

Okuduğumuz bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak onaylanması, düşüncemize göre, amaç ve kalite olarak tamamen uygundur.

Prof. Dr. Barbaros ÖZER
Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri

1- Prof.Dr.Barbaros ÖZER (Danışman)

2- Doç.Dr.Gülsün AKDEMİR EVRENDİLEK

3- Yrd.Doç.Dr.Ebru ŞENEL

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDE PRODUCTION CAPACITIES OF SOME ENTEROCOCCUS SPECIES IN MILK

Seyhan, Fethi

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Barbaros Özer

April 2012, xiii+72 pages

Milk proteins are recognized as rich sources of bioactive peptides. It has however been demonstrated that the effect of bioactive peptides on angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition is dependent upon bacterial strains/species and time. In the present work, 21 wild strains of two different *Enterococcus* species (*Ent. faecium* and *Ent. faecalis*) isolated from traditional fermented dairy products were tested regarding their ACE-I inhibition activities. In this regard, UHT milks were inoculated with *Enterococcus* strains separately and the fermented milks were stored 30 days at 4 °C. Results obtained indicated that no clear correlation was evident between the counts of *Ent. faecium* and *Ent. faecalis* colonies and their ACE inhibition capacities. In all samples, the ACE inhibition ratios were between 46.13% and 89.61% at the beginning of storage period. The variation in the ACE inhibition capacities of the strains tested over the time course showed a strain-dependent characteristics. The ACE inhibition capacities of six strains of *Ent. faecium* decreased by 2.95%-19.16% during cold storage, the ACE inhibition capacities of nine strains increased by 7.15%-32.43 in the same period. These figures were recorded as 1.0%-28.73% (four strains) and 1.80%-36.92% (two strains) for *Ent. faecalis*. No direct relationship was also recorded between OPA proteolysis, electrophoresis and %ACE inhibition ratios of the strains. Regarding IC₅₀ values, the ACE inhibition capacities of the strains were well below the medicines used in treatment of hypertension.

Keywords: *Enterococcus* spp., ACE inhibition activity, bioactive peptide, milk

ÖZET

BAZI ENTEROCOCCUS TÜRLERİNİN SÜTTE BİYOAKTİF PEPTİD ÜRETME YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

Seyhan, Fethi

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Barbaros Özer

Nisan 2012, xiii+72 sayfa

Süt proteinleri, önemli bir biyo-aktif peptid kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, önceki çalışmalarda biyo-aktif peptidlerin angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyon etkilerinin bakteri suşuna ve zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında, geleneksel fermente süt ürünlerinden izole edilen (wild-type) iki farklı *Enterococcus* türüne (*Ent. faecium* ve *Ent. faecalis*) ait toplam 21 suşun ACE inhibitör peptid oluşturma düzeyleri test edilmiştir. Bu amaçla UHT sütler enterokok suşları ile ayrı ayrı inoküle edilmiş ve 30 gün süre ile 4 °C’de depolanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis*’e ait suşların toplam bakteri sayıları ile ACE inhibitör peptid oluşturma düzeyleri arasında herhangi bir korelasyonun bulunmadığı ve tüm örneklerde %ACE inhibisyon oranlarının depolamanın başlangıcında %46.13 ile %89.61 arasında değiştiği saptanmıştır. ACE inhibisyon oranlarının süreye bağlı değişimi ise suşa bağımlı bir karakter göstermiştir. Depolama sürecinde *Ent. faecium*’a ait 6 suşun ACE inhibisyon yeteneği %2.95-%19.16 arasında azalırken, 9 suşun inhibisyon oranları %7.15-32.43 aralığında artmıştır. *Ent. faecalis* için bu değerler aynı sıra ile %1-%28.73 (4 suş) ve %1.80-%36.92 (2 suş) olarak gerçekleşmiştir. Örneklerin OPA değerleri, elektroforetik özellikleri ve ACE inhibisyon oranları karşılaştırıldığında da proteoliz düzeyi ile ACE inhibisyon yeteneği arasında direkt bir ilişki olmadığı görülmüştür. IC₅₀ değerleri değerlendirildiğinde ise enterokok suşlarının ACE inhibisyon kapasitelerinin yüksek tansiyon ilaçlarının ACE inhibisyon etkinliğinin altında kaldığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus* spp., ACE inhibisyon aktivitesi, bioaktif peptid, süt

Aileme

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarına kadar her noktada yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e özellikle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca bana her konuda destek veren ve yardımcı olan sayın Uzman Hülya YAMAN'a ve çalışmamda kullandığım bakteri suşlarını sağlayan sayın Yrd.Doç.Dr.Hüseyin Avni KIRMACI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Son olarak desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim Emine SEYHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ABSTRACT.....	iii
ÖZET.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Giriş.....	4
2.2. Enzimatik Hidrolizasyon Yolu ile Biyo-aktif Peptid Üretimi.....	5
2.3. Mikrobiyel Fermentasyon Yolu ile Biyo-aktif Peptid Üretimi.....	6
2.4. ACE İnhibitör Peptidlerin Fonksiyonel Özellikleri.....	11
2.5. Enterokokların Proteolitik ve Diğer Metabolik Aktiviteleri.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Yağsız UHT süt.....	21
3.1.2. Bakteri suşları ve gelişim koşulları	21
3.1.3. Kimyasal malzemeler	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Bakteri aktivasyonu	23
3.2.2. UHT süt hidrolizasyonu.....	23
3.2.3. Angiotensin (ACE) inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi.	24
3.2.4. Proteolitik aktivitenin belirlenmesi.....	26

3.2.5. Teknolojik parametreler.....	26
3.2.5.1. Bakteri gelişimi.....	26
3.2.5.2. pH ve asitlik gelişimi.....	27
3.2.5.3. SDS-PAGE profillerinin belirlenmesi.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. <i>Enterococcus faecium</i> ve <i>Ent. faecalis</i> Suşlarının Aktivasyonu..	30
4.2. Hidrolizasyon Sürecinde <i>Enterococcus faecium</i> ve <i>Ent. faecalis</i> Suşlarının Koloni Sayılarında Meydana Gelen Değişimler.....	32
4.3. Depolama Sürecinde <i>Enterococcus faecium</i> ve <i>Ent. faecalis</i> Suşlarının Koloni Sayılarında Meydana Gelen Değişimler.....	34
4.4. pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri Değişimleri.....	34
4.5. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) İnhibitör Peptid Konsantrasyonlarındaki Değişimler.....	42
4.6. <i>Enterococcus faecium</i> ve <i>Enterococcus faecalis</i> Suşlarının Proteolitik Özellikleri.....	48
5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME.....	58
KAYNAKLAR.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Angiotensin converting enzyme
Caco	: Colonic Carcinoma
CPPs	: Caseinophosphopeptides
HHL	: Hippuryl-histidyl-leucine
IC ₅₀	: Half maximal inhibitory concentration
Kob	: Koloni oluşturan birim
IPP	: Isoleusine-proline-proline
LDL	: Low density lipoprotein
OPA	: <i>O</i> -phthaldialdehyde
PepO	: Oligopeptidase
PepN	: Aminopeptidase
RSM	: Responce Surface Methodology
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SHR	: Spontaneously hypertensive rats
TCA	: Triklorasetikasit
UHT	: Ultra high temperature
VPP	: Valine-proline-proline
WSE	: Water Soluble Extract

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Değişik laktik asit bakterilerinin ve ticari enzim preparatlarının oluşturduğu biyo-aktif peptidlerin peptid dizilimi ve etki mekanizmaları.....	9
Çizelge 2.2. Süt proteini kökenli biyo-aktif eptidlerin <i>in vivo</i> insan deneyimelerindeki sonuçları.....	16
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan enterokok izolatlarının suş yakınlığı ve % nükleotid benzerlikleri.....	22
Çizelge 4.1. <i>Ent.faecium</i> ve <i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin IC ₅₀ değerleri.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığı ile kan basıncının regülasyonu	13
Şekil 4.1. 37 °C’de 48 saat süre ile UHT süt içerisinde aktive edilen <i>Ent. faecium</i> suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler.....	31
Şekil 4.2. 37 °C’de 48 saat süre ile UHT süt içerisinde aktive edilen <i>Ent. faecalis</i> suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler.....	31
Şekil 4.3. 30 °C’de 48 saat süre ile hidrolize edilen UHT sütlerde <i>Ent. faecium</i> suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler.....	33
Şekil 4.4. 30 °C’de 48 saat süre ile hidrolize edilen UHT sütlerde <i>Ent. faecalis</i> suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler.....	33
Şekil 4.5. <i>Ent. faecium</i> koloni sayılarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler	35
Şekil 4.6. <i>Ent. faecalis</i> koloni sayılarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler	35
Şekil 4.7. <i>Ent. faecium</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde pH değişimleri.....	36
Şekil 4.8. <i>Ent. faecalis</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde pH değişimleri.....	36
Şekil 4.9. <i>Ent. faecium</i> ile inoküle edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde pH değişimleri.....	39

Şekil 4.10.	<i>Ent. faecalis</i> ile inoküle edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde pH değişimleri.....	39
Şekil 4.11.	<i>Ent. faecium</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde laktik asit (%) değişimleri.....	40
Şekil 4.12.	<i>Ent. faecalis</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde laktik asit (%) değişimleri.....	40
Şekil 4.13.	<i>Ent. faecium</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde laktik asit (%) değişimleri	41
Şekil 4.14.	<i>Ent. faecalis</i> ile hidrolize edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde laktik asit (%) değişimleri.....	41
Şekil 4.15.	<i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin %ACE inhibisyon oranlarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler	43
Şekil 4.16.	<i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin %ACE inhibisyon oranlarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler	43
Şekil 4.17.	<i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 1. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki	45
Şekil 4.18.	<i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 1. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki	45
Şekil 4.19.	<i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 30. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki	46
Şekil 4.20.	<i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 30. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki	46
Şekil 4.21.	<i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde OPA proteoliz değerlerinde 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler.....	50

Şekil 4.22. <i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde OPA proteoliz değerlerinde 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler.....	50
Şekil 4.23. <i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 1. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki.....	52
Şekil 4.24. <i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 1. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki.....	52
Şekil 4.25. <i>Ent. faecium</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 30. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki.....	53
Şekil 4.26. <i>Ent. faecalis</i> suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 30. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki.....	53
Şekil 4.27. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının depolamanın 1. gününe ait elektroforetogramları.....	55
Şekil 4.28. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının depolamanın 30. gününe ait elektroforetogramları.....	55
Şekil 4.29. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının depolamanın 1. ve 30. gününe ait elektroforetogramları.....	56

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Hipertansiyon ya da yüksek kan basıncı ile kardiyovasküler hastalıklar ve özellikle kalp krizi arasında direkt bir ilişki bulunmaktadır. Yüksek tansiyon, gelişmiş ülkelerde en yaygın kronik hastalıklar arasında yer alırken, gelişmekte olan ülkelerde de yüksek tansiyon hastalarının sayısı giderek artmaktadır (Vermeirssen ve ark., 2002). Yüksek tansiyonun gelişmekte olan ülkelerde görülen doğal ölümlerin %1-8'inin nedeni olduğu ve Latin Amerika ve Karayipler'de bu değerlerin çok yüksek seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir (Kusump, 2006). Son yirmi yıl boyunca yürütülen epidemiyolojik çalışmalar yüksek miktarda süt tüketen bireylerde kan basıncı (tansiyon) düzeylerinin optimum olduğunu; buna karşın, az miktarda süt tüketen bireylerde hipertansiyon sorununun daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur (Ackley ve ark., 1983; Garcia-Palmieri ve ark., 1984). Süt, anti-hipertansif (tansiyon düşürücü) etki gösteren kalsiyum (Griffith ve ark., 1999), potasyum (Dickinson ve ark., 2006) ve magnezyum (Capuccio ve MacGregor, 1991) gibi bazı mineralleri yüksek düzeylerde içermektedir. Kalsiyum, yağ metabolizmasını hızlandırdığından kilo kaybını tetikleyerek yüksek tansiyonun düşürülmesinde etkili olurken; potasyum, sodyum tarafından oluşturulan kan basıncı artışını dengeleyerek benzer etki yapmaktadır. Magnezyumun anti-hipertansif mekanizması ise henüz tam olarak çözülememiştir. Süt temelli minerallerin anti-hipertansif etkilerinin varlığı son 20

yıldır bilinmesine karşın, süt temelli peptidlerin benzer etki mekanizmaları üzerine çalışmalar oldukça yenidir.

ACE, angiotensin-I'nın potansiyel bir vasokonstriktör olan angiotensin-II'ye dönüşümünü katalizleyerek kan basıncı artışına neden olmaktadır. ACE-inhibitör peptidler ilk kez 1960'lı yıllarda yılan zehirinde- *Bothrops jararaca*, Brazilian snake-tanımlanmıştır (Ariyoshi, 1993). Son yıllarda, ACE-I (angiotensin converting enzyme-I, exopeptidase EC 3.4.15.1) inhibisyonu ile hipertansiyonun kontrolü üzerine klinik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, ACE inhibisyonunda etkili faktörler arasında biyo-aktif peptidlerin de olduğu anlaşıldıktan sonra, biyo-aktif peptid kaynakları üzerinde araştırmalar yoğunlaştırılmıştır. Bakteriyal kollagenaz ile hidrolize edilen jelatinden açığa çıkan peptidlerin ACE-inhibisyon yeteneğine sahip olduğunun bulunmasının ardından gıda proteinlerinin de önemli birer ACE-inhibitör kaynağı olduğu saptanmıştır. Ardından, sardalya (Suetsuna ve Osajima, 1989; Matsui ve ark., 1993), mısır proteini (zein) (Miyoshi ve ark., 1991; Yano ve ark., 1996), palamut (Yokoyama ve ark., 1992) ve kalamarda da (Wako ve ark., 1996) ACE-inhibitör peptid varlığı saptanmıştır. Süt proteinleri de (kazeinler ve serum proteini fraksiyonları) biyo-aktif peptidler açısından oldukça zengin birer kaynaktır (Maruyama ve Suzuki, 1982; Maruyama ve ark., 1985; Mullally ve ark., 1997a; Abubakar ve ark., 1998). Gerek ürün işleme sırasında gerekse ürünün depolama/ olgunlaştırma sürecinde laktik asit bakterilerinin (starter ve yardımcı kültür-adjunct culture) proteolitik etkileri sonucunda serbest kalan peptidlerin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerinde yürütülen çalışmalarda biyo-aktif peptidlerin ACE inhibisyon etkilerinin bakteri suşuna ve zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdikleri belirlenmiştir. Konu ile ilgili olarak günümüze kadar

yürütülen çalışmalarda ACE-inhibitör peptidlerin üretiminin laktik asit bakterileri için genel bir özellik olmadığı ortaya konulmuştur. Laktik asit bakterileri arasında *Lactobacillus* spp.'lerin ACE inhibitör peptid üretimi açısından yüksek potansiyele sahip olduğu bilinmekle birlikte diğer süt ürünleri kökenli bakterilerin de benzer aktiviteye sahip olma olasılıkları bulunmaktadır.

Geleneksel olarak dışkı kökenli kontaminasyonların bir indikatörü olarak kabul edildiği için starter kültür olarak süt ürünlerinde kullanımı yaygın olmayan, ancak son yıllarda bazı suşlarının probiyotik karakter taşıdığı ortaya konulduğu için fonksiyonel özellikleri araştırılmaya başlanan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un ACE inhibitör peptid üretme yeteneği üzerine çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu noktadan hareket ile geleneksel süt ürünlerimizden izole edilen ve henüz ticari olarak kültüre alınmamış olan ve vankomisin direnci göstermeyen (insan orijinli) *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* suşlarının ACE inhibitör peptid üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve bu özelliğin kültür seçimi için bir kriter olarak tanımlanması önem taşımaktadır. Buradan elde edilecek olan sonuçlar sonraki araştırmalar kapsamında söz konusu enterokok suşlarının aynı zamanda probiyotik özellik gösterip göstermediklerinin araştırılmasına ışık tutacaktır. Bu çalışma kapsamında kültür koleksiyonumuzda yer alan ve geleneksel süt ürünlerimizden izole edilerek 16S rDNA analizi ile moleküler karakterizasyonu yapılan *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* suşlarının (toplam 21 suş) ACE inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi ve sınıflandırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, yüksek ACE inhibitör peptid aktivitesi gösteren suşlar fermente süt içeceği üretiminde kullanılmış ve 30 günlük depolama sürecinde ACE inhibitör peptid üretme yeteneğindeki değişimler izlenmiştir.

BÖLÜM II

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Giriş

Proteinlerin insan beslenmesinde oynadığı aktif fizyolojik rol konusunda bilim insanları arasında görüş birliği oluşmuş durumdadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Gıdalarda doğal olarak bulunan birçok protein ya direkt olarak ya da *in vivo/ in vitro* ortamlarda enzimatik hidrolizasyon sonucunda fizyolojik etki göstermektedir. Son yıllarda, belirli proteinlerin biyolojik olarak aktif peptidler açısından oldukça zengin birer kaynak olduğu ortaya konulmuştur. Biyo-aktif peptidler, parent protein dizilimi içerisinde inaktif formdadır ve üç farklı yolla aktive olmaktadır. Bunlar;

- a) sindirim enzimleri aracılığı ile hidrolizasyon,
- b) proteolitik mikroorganizmalar aracılığı ile hidrolizasyon ve
- c) mikroorganizmalar ya da bitkilerden açığa çıkan enzimler kanalı ile hidrolizasyondur (Gobbetti ve ark., 2004).

Biyo-aktif peptidler, vücut fonksiyonları üzerinde pozitif etkiye sahip olan ve dolayısıyla insan sağlığını geliştirici rolü bulunan, spesifik protein parçacıkları olarak tanımlanmaktadır (Kitts ve Weiler, 2003). Biyo-aktif peptidlerin fonksiyonel özellikleri peptid zincirindeki aminoasit kompozisyonu ve dizilimi ile yakından

ilişkilidir. Aktif bir peptid dizisinin boyutu 2-20 aminoasit arasında değişmektedir (Meisel ve FitzGerald, 2003).

Biyo-aktif peptidler; kardiyovasküler sistem (anti-hipertansif, anti-oksidatif, anti-trombotik, hipokolesterolemik), sinir sistemi (opioid, agonistik, antagonistik etki), gastrointestinal sistem (mineral bağlama, iştah kesici etki, anti-mikrobiyel etki) ve bağışıklık sistemi (sitomodülatör, immünomodülatör ve anti-mikrobiyel etki) üzerinde olumlu etkilere sahiptir (Guo ve ark., 2009; Korhonen ve Pihlanto, 2006). Günümüzde süt proteinleri önemli bir biyo-aktif peptid kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Regazzo ve ark., 2010; Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2004; Matar ve ark., 2003; Clare ve Swaisgood, 2000).

2.2. Enzimatik Hidrolizasyon Yolu ile Biyo-aktif Peptid Üretimi

Biyo-aktif peptidlerin üretiminde yararlanılan en yaygın yol protein molekülünün enzimatik hidrolizasyonudur. Birçok biyo-aktif peptid, pepsin ve tripsin içeren gastrointestinal enzimler aracılığı ile açığa çıkmaktadır. Angiotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü peptidler ve kalsiyum bağlayan peptidler (CPPs) ağırlıklı olarak tripsin etkisi ile açığa çıkmaktadır (FitzGerald ve ark., 2004; Gobbetti ve ark., 2004; Meisel ve FitzGerald, 2003; Yamamoto ve ark., 2003). Kazeinden açığa çıkan ACE-inhibitör peptidler kazokinin (Meisel ve Schlimme, 1994), serum proteinlerinden açığa çıkan inhibitör peptidler ise laktokinin (FitzGerald ve Meisel, 1999) olarak adlandırılmaktadır. Son on yılda, sığır α_{s2} -kazeinin triptik hidrolizatlarında da ACE-inhibitör peptid varlığı tespit edilmiştir (Tauzin ve ark., 2002). Benzer şekilde; sığır, koyun ve keçi sütü kazeinlerinden de tripsin etkisiyle

ACE-inhibitör peptid oluştuğu ortaya konulmuştur (Manso ve ark., 2003). Diğer sindirim enzimleri ile bakteri ve kũf kũkenli alkalaz, kimotripsin, pankreatin, pepsin ve termolisin içeren proteinaz kombinasyonlarının da değişik protein kaynaklarından ACE inhibitör peptidler başta olmak üzere biyo-aktif peptid ũretebildikleri belirlenmiştir (Kilara ve Panyam, 2003; Korhonen ve Pihlanto, 2003). Proteolitik enzimler aracılığı ile doğal protein kaynaklarından biyo-aktif peptid eldesinin yanı sıra son yıllarda spesifik peptid ũretiminde rekombinant DNA teknolojisinden de yararlanılmaya başlanmıştır. Kim ve ark. (1999), rekombinant insan sũtũ α_{s1} -kazeinini *Eschericia coli* ũzerinde çoğaltıp saflaştırmayı başarmıştır. Bu şekilde ũretilen rekombinant α_{s1} -kazeinin tripsin ile proteolize uğraması sonucunda birçok ACE-inhibitör peptid oluşumu belirlenmiştir.

2.3. Mikrobiyel Fermentasyon Yolu ile Biyo-aktif Peptid ũretimi

Birçok endũstriyel starter kũltũr yũksek proteolitik aktiviteye sahiptir; ancak, çoğunluğunun ACE inhibisyon aktivitesine sahip peptid oluşturma yeteneği bulunmamaktadır (Hernandez-Ledesma ve ark., 2004; Pihlanto-Leppũlũ ve ark., 1998). Fermente sũt ũrũnlerinin ũretimi sırasında kullanılan bazı starter ve starter olmayan laktik asit bakterileri aracılığı ile biyo-aktif peptid ũretimi sũz konusudur. Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi hũcre duvarına tutulu proteinaz ve intraselũler peptidazları (aminopeptidaz, endopeptidaz, tripeptidaz ve dipeptidaz) içermektedir (Christensen ve ark., 1999). Konu ile ilgili çalışmaların ũnemli bũlũmũ geleneksel Emmental peynirinin ũretiminde starter kũltũr olarak kullanılan *Lactobacillus helveticus* (*Lb. helveticus*)’un birçok suşunun ACE-inhibitör peptid ũretebildiđini ortaya koymuştur (Fuglsang ve ark., 2002; Leclerc ve ark., 2002;

Nakamura ve ark., 1995a; Robert ve ark., 2004; Sipola ve ark., 2001; Yamamoto ve ark., 1999). En yaygın bilinen ACE-inhibitör peptid olan Val-Pro-Pro (VPP) ve Ile-Pro-Pro (IPP), *Lb. helveticus* suşları tarafından üretilmektedir (IC₅₀ değerleri sırasıyla 5µM ve 9 µM) (Nakamura ve ark., 1995b; Sipola ve ark., 2002; Quiros ve ark., 2007). Minervini ve ark. (2003) kısmen saflaştırılan *Lb. helveticus* PR4 proteazının 6 farklı süt türünden (inek, koyun, keçi, manda, domuz ve insan sütü) ACE-inhibitör peptid açığa çıkarma yeteneğini araştırdıkları çalışmalarında en yüksek ACE inhibisyonunun domuz sütü sodyum kazeinat hidrolizatı kaynaklı bir tripeptidten (Pro-Gly-Pro) kaynaklandığını bulmuştur. Diğer süt türlerinde ise değişen oranlarda ACE-inhibitör peptid varlığı saptanmıştır. Genel olarak, peptid zincirinin C-terminal bölgesine yakın konumda bir prolin residüsünün varlığı ACE inhibitör peptid oluşumu için gerekli görülmektedir. Bunun temel gerekçesi, prolinin dayanıklı bir halka yapısına sahip olması ve buna bağlı olarak karboksil grubunun konfigürasyonunun stabil tutularak enzimin (ACE) aktif bölgesi ile anahtar-kilit modeline göre reaksiyona girebilmesidir (Cushman ve ark., 1977). Biyo-aktif peptidlerin ACE-inhibisyon düzeyleri ile C-terminale sahip dipeptid varlığı arasındaki ilişki konusunda çelişkili bulgular bulunmaktadır. Örneğin; Minervini ve ark. (2003), *Lb. helveticus* PR4 proteazının açığa çıkardığı ve yüksek ACE-inhibisyon yeteneğine sahip tripeptidlerin bu özelliklerinin C-terminal dizisine bağlı olduğunu belirtirken, Tauzin ve ark. (2002) yüksek ACE-inhibisyon kapasitesine sahip kazokininden C-terminal peptidlerin uzaklaştırılması sonucunda ACE-inhibisyon yeteneğinde değişiklik meydana gelmediğini bildirmiştir. Quiros ve ark. (2007) ise *Ent. faecalis* CECT 5727 tarafından β-kazeinin hidrolizasyonu ile açığa çıkarılan ACE inhibitör peptidlerin tamamının C-terminal bölgesinde zengin prolin içerdiğini bulmuştur.

Son yıllarda, biyo-aktif peptidlerin ACE-inhibisyon düzeyleri ile peptid molekülü büyüklüğü arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (Regazzo ve ark., 2010; Miguel ve ark., 2009). Buna göre; pepsin ile hidrolize edilen inek sütü kazein hidrolizatında bulunan ve 3000 Dalton'dan daha düşük molekül ağırlığına sahip olan fraksiyonların ACE inhibisyon kapasitelerinin büyük moleküllü fraksiyonlara oranla 10 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Miguel ve ark., 2009). Konu ile ilgili çalışmalarda, biyo-aktif karakter taşıyan peptidlerin aminoasit dizilimleri ile peptid zinciri sayısının, protein kaynağı ve bakteri suşu ile hidrolizasyon koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği anlaşılmıştır (Çizelge 2.1.).

Biyo-aktif peptidlerin anti-hipertansif mekanizmaları bir proteolitik enzim (ACE) inhibisyonu temeline dayandığından, bu peptidlerin benzer bir mekanizma ile diğer laktik asit bakterisi kökenli proteolitik enzimler üzerinde de etki gösterip göstermediği tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte; ACE-inhibisyonuna benzer bir etki söz konusu ise, bu durumda biyo-aktif peptidlerin gıda eko-sistemi içerisinde mikroorganizma ve enzim dinamiklerinde de değişime neden olması kaçınılmazdır. Konu ile direkt ilintili fazla sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, β -kazein $f(58-72)$ bölgesinin (β -casomorphin-7 içermektedir) Cheddar, Jarlsberg ve Crescenza peynirlerinde proeolize bağlı olarak serbest hale geçmesi ile birlikte PepO (non-caseolytic oligopeptidase) ve PepN (aminopeptidase)'in inhibe olduğu saptanmıştır (Stepniak ve ark., 1995; Smacchi ve Gobbetti, 1998). Benzer şekilde; anti-hipertansif etkiye sahip β -kazein $f(193-209)$ ve β -kazein $f(194-209)$ peptidlerin laktik asit bakterilerinin endopeptidaz ve aminopeptidaz aktivitelerini kısmen inhibisyona uğrattığı bildirilmiştir (Gobbetti ve ark., 2002).

Çizelge 2.1. Değişik laktik asit bakterilerinin ve ticari enzim preparatlarının oluşturduğu biyo-aktif peptidlerin peptid dizilimi ve etki mekanizmaları.

Mikroorganizma	Protein kaynağı	Peptid dizilimi	Biyoaktivite	Kaynak
<i>Lb. helveticus</i> , <i>Sac. cerevisiae</i> <i>Lb. helveticus</i> C90 proteinaz	β -CN, κ -CN β -CN	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro Lys-Val-Leu-Pro-Val- Pro-(Glu) Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala- Val-Pro-Tyr-Pro-Gln- Arg, Thr-Thr-Met-Pro- Leu-Trp	ACE inhibisyonu, anti-hipertansif etki ACE inhibisyonu Uyuşturucu, ACE inhibisyonu, bağışıklık geliştirici	1 2 3
<i>Lactobacillus</i> GG enzimleri + pepsin ve tripsin <i>Lb. helveticus</i> CPN4 <i>Lb. bulgaricus</i> SS1, <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4 <i>Lb. bulgaricus</i> IFO13953	β -CN, α_{s1} - CN Serum proteinleri β -CN, κ -CN κ -CN	Tyr-Pro -	ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu	4 5
<i>Lb. rhamnosus</i> + pepsin ve Corolase PP ile hidrolizasyon <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	β -CN β -CN	Ala-Arg-His-Pro-His- Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val- Leu, Val-Lys-Glu-Ala-Met- Ala-Pro-Lys Ser-Lys-Val-Tyr-Pro- Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	ACE inhibisyonu Antioksidatif ACE inhibisyonu	6 7 8
<i>Str. thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> <i>Lb. helveticus</i> JCM 1004 <i>Lb. helveticus</i> NCC 2765 Belirtilmemiş Karışık laktik asit bakterileri ve Prozyme 6 NSLAB <i>Lb. helveticus</i> 130B4 Protease N, Umamizyme, Flavourzyme 500L <i>Chorella vulgaris</i> NSLB* Protease N Amano	β -CN Yağsız süt hidrolizati Sodyum kazeinat hidrolizati Fermente keçi sütü Fermente yağsız süt İsviçre tipi peynirler Yağsız deve sütü Modifiye peynir Alg proteinleri Süt proteinleri β -Lg	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro NENLLRFFVAPFPEVFG TGPIPN, SLPQ, SQPK Gly-Thr-Trp, Gly-Val-Trp Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys- Asn-Gln-Asp Met-Ala-Pro, Leu-Gln-Prc Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro- Asn-Arg-Pro-Gln-Phe Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro SAPLRVY	ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu ACE inhibisyonu	8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

* NSLB: non-starter lactic acid bacteria

Kaynaklar: ¹Nakamura ve ark. (1995ab), ²Maeno ve ark. (1996), ³Rokka ve ark. (1997), ⁴Yamamoto ve ark. (1999), ⁵Gobbetti ve ark. (2000), ⁶Kudoh ve ark. (2001), ⁷Hernandez-Ledesma ve ark. (2004), ⁸Ashar ve Chand (2004), ⁹Pan ve ark. (2005), ¹⁰Robert ve ark. (2004), ¹¹Geerlings ve ark. (2006), ¹²GuanWen ve ark. (2007), ¹³Bütikofer ve ark. (2007), ¹⁴Shuangquan ve ark. (2008), ¹⁵Tonouchi ve ark. (2008), ¹⁶Sheih ve ark. (2009), ¹⁷Nielsen ve ark. (2009), ¹⁸Ortiz-Chao ve ark. (2009)

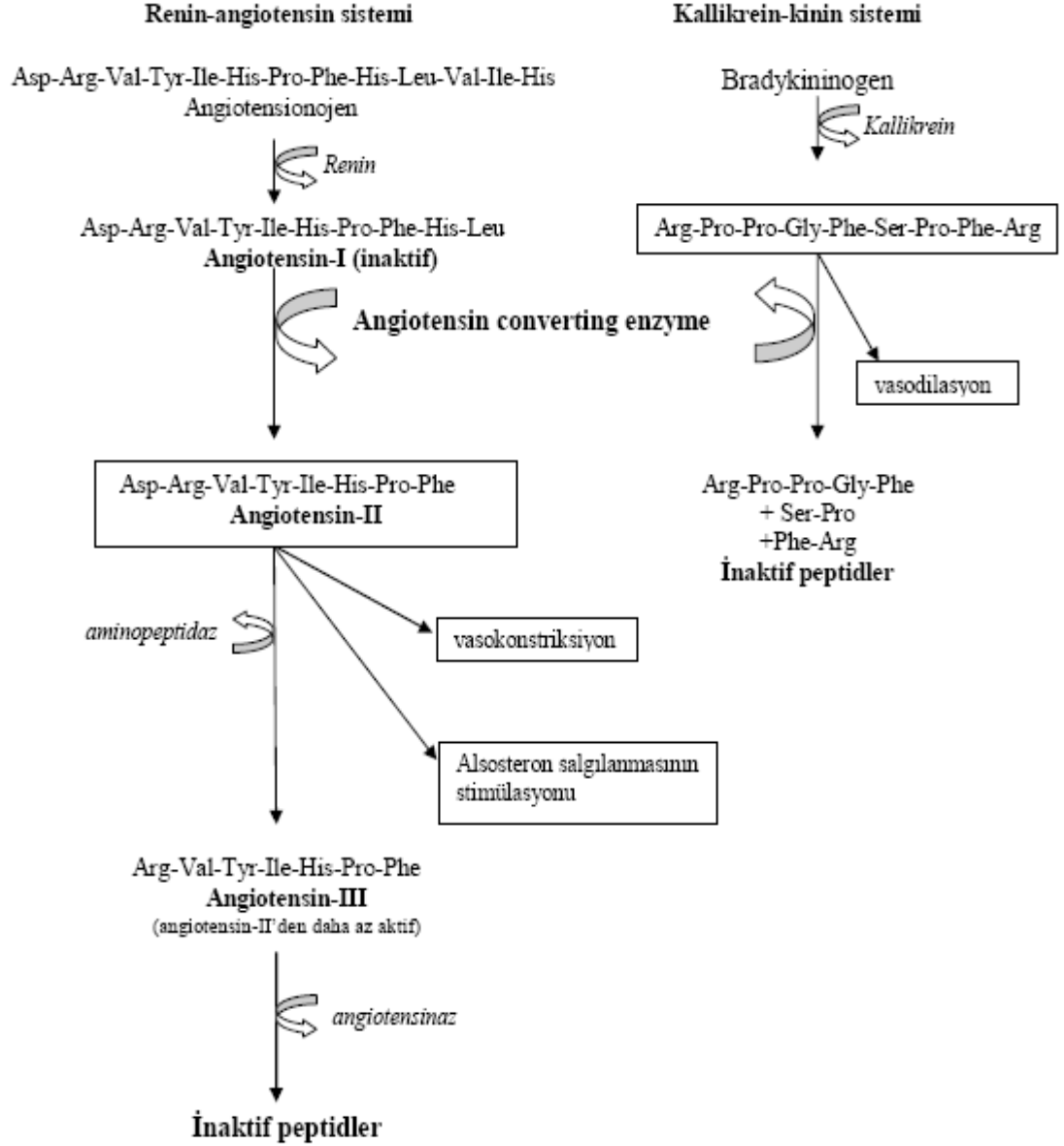
ACE-inhibisyonu üzerine gerçekleştirilen bilimsel çalışmaların ağırlıklı bölümünü bakteriler ve bakteri kökenli proteolitik enzimlerin açığa çıkardığı biyo-aktif peptidlerin karakterizasyonu oluşturmaya karşın, laktik asit bakterilerinin hangi suşlarının, hangi koşullar altında bu peptidleri açığa çıkardığı konusunda çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Örneğin; Pihlanto-Leppälä ve ark. (1998) Chr. Hansen ve Valio Ltd. tarafından geliştirilen mezofilik ve termofilik starter kültürleri kullanarak ürettiği fermente süt ürünleri ile peynirlerin hiç birisinde ACE-I inhibisyon etkisinin varlığını saptamamıştır. Buna karşın; Shim ve ark. (1996) *Lactobacillus casei* HY418 kullanarak ürettiği fermente sütte %65 dolayında ACE inhibisyon aktivitesi elde etmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis*'in birçok suşu da ACE inhibisyon aktiviteleri bakımından incelenmiş ve inhibisyon etkisine sahip peptid düzeylerinin hem bakteri suşuna hem de fermentasyon koşullarına göre değişim gösterdiği bulunmuştur (Gobbetti ve ark., 2000; Donkor ve ark., 2007). Stefanova ve ark. (2009) geleneksel ürünlerden izole ettikleri 72 laktobasil suşu üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında 13 suşun %50-60, 6 suşun ise %60 ve daha üzeri düzeyde ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmalar

sonucunda *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un bazı suşlarının oldukça yüksek ACE inhibitör peptid üretme potansiyelinin olduğu ortaya konulmuştur.

2.4. ACE İnhibitör Peptidlerin Fonksiyonel Özellikleri

Angiotensin-I-dönüştürücü enzim, renin angiotensin sistemine bağlı bir enzimdir ve periferel kan basıncını regüle etmektedir (Şekil 2.1). Renin-angiotensin sisteminin bir parçası olan angiotensin-I'in ACE hidrolizi ile etkili bir vasokonstriktör olan angiotensin II'ye dönüşümü ve bu arada bradykinin yıkımı gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak da kan basıncı artış göstermektedir. ACE'nin inhibisyonu sonucunda ACE-I'nın ACE-II'ye dönüşümü engellenmekte ve vasodilatör bradykinin yıkımı önlenmekte ve kan basıncı kontrol altına alınabilmektedir. ACE-I inhibitör peptidler dışında bazı mekanizmalar aracılığı ile de anti-hipertansif etki gözlenebilmektedir. Bu mekanizmalar; endothelial hücrelerde endothelin-I'in serbest hale gelişinin inhibisyonu (Maes ve ark., 2004), bradykinin aktivitesinin stimülasyonu (Perpetuo ve ark., 2003), endothelium kaynaklı nitrik oksit üretiminin artması (Sipola ve ark., 2002) ve opiat reseptörlerine bağlanmayı regüle eden vasodilatör etkinin gelişmesidir (Nurminen ve ark., 2000). Fuglsang ve ark. (2003), 9 farklı süt proteini kökenli kısa zincirli peptidi ACE-inhibitör yetenekleri bakımından incelemiş ve 8 peptidin çok etkili inhibitör kapasiteye sahip olduğunu belirlemiştir. Anti-hipertansif etki için aktif peptidlerin değişime uğramadan bağırsakta emilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte; ACE-inhibitör peptid olan VPP'nin Caco-2 hücre katmanından paraselüler ve transselüler yollar ile değişime uğramadan geçmesine karşın önemli miktarda peptidin intraselüler peptidazlar aracılığı ile hidrolize olduğu saptanmıştır (Satake ve ark., 2002). Prolin içeren peptidler genelde sindirim enzimleri ile degradasyona karşı

daha dirençlidir. Masuda ve ark. (1996) VPP ve IPP içeren fermente sütleri oral yolla tüketen spontan hipertansif deney farelerinin (Spontan Hypertensive Rats-SHR-Wistar rats) abdominal aortalarında bu iki tripeptidin varlığını tespit etmişlerdir. Buna karşın; β -laktoglobulin'in $f(142-148)$ triptik hidrolizasyonu sonucu oluşan ve potansiyel bir ACE inhibitör olarak tanımlanan Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg'in gastrointestinal sistemde yeterince stabil olmadığı (Mullally ve ark., 1997b) ve oral tüketimin ardından serum proteinaz ve peptidazları aracılığı ile degradasyona uğrayarak hipertansif etki gösterdiği de ortaya konulmuştur (Walsh ve ark., 2004). Oysa ki; β -laktoglobulin'in $f(142-148)$ triptik hidrolizasyonu sonucu oluşan peptid dizisinin IC_{50} değeri (ACE'nin en az %50'sini inhibe edebilecek biyo-aktif peptid düzeyi) oldukça yüksek bulunmuştur (42.6 μ g). Bu peptid dizisinin gastrointestinal koşullara karşı direnci konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin; Vermeirssen ve ark. (2002) bu peptidin gastrointestinal sistemden etkilenmeden geçtiğini, ancak çok düşük düzeylerde Caco-2b monokatmanından penetre olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde; α -laktalbumin $f(50-53)$ - α -lactorphin olarak da adlandırılan ve Tyr-Gly-Leu-Phe içeren bir tetra peptiddir- *in vivo* koşullarda anti-hipertansif etki göstermekle birlikte bu etkinin başka *in vivo/ in vitro* koşullarda görülmediği belirlenmiştir (Nurminen ve ark., 2000; Ijäs ve ark., 2004). Robert ve ark. (2004), *Lactobacillus helveticus* NCC 2765'in önemli bir ACE-inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu ve özellikle bu bakteri proteazları tarafından β -kazeinden açığa çıkarılan peptidlerin *in vitro* koşullarda simüle edilmiş gastrik hidrolizasyona direnç gösterdiğini ancak α_{s1} -kazeinden açığa çıkarılan peptidlerin aynı direnci gösteremediklerini belirlemiştir. Bu sonuçlar, potansiyel ACE-inhibitör peptidlerin *in vitro* koşullarda gösterdiği biyo-aktif etkinin *in vivo* koşullarda her zaman görülemeyebileceğine işaret etmektedir.



Şekil 2.1. Angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığı ile kan basıncının regülasyonu (Kusump, 2006)

ACE-inhibitör peptid oluşumu açısından genel olarak süt kazeinleri zengin bir kaynak olmakla birlikte (Okamoto ve ark., 1995; Pihlanto-Leppälä ve ark., 1998; Pripp ve ark., 2004) serum proteinlerinin de ACE-inhibitör peptidler açısından önemli birer başlangıç noktası olduğu da bilinmektedir. Özellikle, β -laktoglobulin'in gerek pankreatik enzimler gerekse fungal/bakteriyel kökenli proteolitik enzimler

aracılığı ile hidrolizasyonu sonucu açığa çıkan peptidlerin ciddi bir ACE-inhibisyon potansiyelinin olduğu anlaşılmıştır (Ortiz-Chao ve ark., 2009; Chobert ve ark., 2005). RSM (Cevap Yüzey Metodolojisi) yardımı ile serum proteinlerinden ACE-inhibitör peptidlerin açığa çıkarılması için gerekli optimum koşulların belirlendiği bir çalışmada hidrolizasyon için gerekli olan enzim/substrat (E/S) oranı, pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 0.60, 9.18 ve 38.9 °C olarak belirlenmiştir (Guo ve ark., 2009). Farklı proteolitik enzimlerin süt proteini hidrolizasyon seviyeleri hem kalitatif hem de kantitatif farklılıklar gösterdiğinden bu enzimler tarafından açığa çıkarılan ACE inhibitör peptidlerin aminoasit dizilimi ve konsantrasyonları da farklılık gösterebilmektedir. Örneğin; Otte ve ark. (2007) gerçekleştirdikleri bir çalışmada ACE-inhibitör peptid oluşturma yetenekleri bakımından proteazları termolisin>proteinase K>pepsin>*Bacillus licheniformis* proteazı olarak sıralamışlardır.

Farklı laktik asit bakteri türleri tarafından fermente edilen süt ürünlerinde değişik ACE-inhibitör peptidlerin üretimi de sözkonusudur. Örneğin; Rokka ve ark. (1997), *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ile fermente edilen UHT sütlerin pepsin ve tripsin aracılığı ile hidrolizasyonu sonucunda önemli düzeyde ACE-inhibitör peptid oluştuğunu saptamıştır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ile fermente edilen ve ardından pepsin ve/veya tripsin ile hidrolize edilen fermente süt ürünlerinde α_{s1} -CN f(142-147)(Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro), f(157-164)(Asp-Ala-Tyr-Pro-Ser-Gly-Ala-Trp) ve f(194-199)(Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp) kaynaklı çok sayıda etkin ACE-inhibitör peptid varlığı belirlenmiştir (Pihlanto-Leppälä ve ark., 1998).

ACE-inhibitör peptid oluşumu açısından peynir oldukça önemli bir kaynaktır. Peynirde ACE-inhibitör peptid oluşumu ve stabilitesi üzerine yürütülen çalışmalarda Rokfor, Leerdam (Meisel, 1998), Gouda (Saito ve ark., 2000), Mozzarella, Italica, Crescenza, Gorgonzola (Smacchi ve Gobetti, 1998) peynirlerinde değişik tri-, tetra-, penta- ve heptapeptidlerin ACE-inhibisyon özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Ryhanen ve ark. (2001) peynirin olgunlaşması sırasında ACE-inhibisyon etkisine sahip peptidlerin konsantrasyonunda değişimler meydana geldiğini saptamıştır. Bu değişim, biyo-aktif peptidlerin proteoliz sırasında ileri hidrolizasyonu sonucu biyo-aktivitelerini yitirmeleri ile ilişkilendirilmektedir (Meisel ve ark., 1997).

Süt proteini orijinli peptid sayısındaki fazlalığa karşın bu peptidlerin çok azı *in vitro* koşullarda kanıtlanmış anti-hipertansif etki göstermektedir (Li ve ark., 2004; Takano, 2002; Yamamoto ve Takano, 1999). Konu ile ilgili çalışmaların çoğunda spesifik süt protein hidrolizatlarının tüketimine bağlı olarak kan basıncında orta veya yüksek düzeyde azalma kaydedilmiştir. Çizelge 2.2.'de bu tip ürünlerin insan klinik deneylerinde kullanımı ile elde edilen sonuçlar sunulmaktadır.

Halen, ACE inhibisyonuna sahip biyo-aktif peptidler kullanılarak üretilen 3 ticari ürün bulunmaktadır. Bunlar; Valio Ltd. (Finlandiya) tarafından piyasaya sürülen Evolus®, Calpis Co Ltd. (Japonya) tarafından üretilen Calpis ve Unilever Ltd. (Hollanda) tarafından üretilen ancak üretimi son yıllarda sembolik düzeye inen Flora Pro-Activ mini drink'tir (Özer ve Kırmacı, 2010).

Çizelge 2.2. Süt proteini kökenli biyo-aktif eptidlerin *in vivo* insan denemelerindeki sonuçları.

Tüketilen ürün	Peptid dizisi	Gözlenen etki	Kaynak
Triptik kazein hidrolizati	α_{s1} - CN	Kan basıncında azalma	Sekiya ve ark. (1992)
Fermente süt	β -CN, κ -CN Val-Pro-Pro/ Ile-Pro-Pro	Kan basıncında azalma	Hata ve ark. (1996)
Fermente süt	Val-Pro-Pro/ Ile-Pro-Pro	Kan basıncında azalma	Seppo ve ark. (2003)
Fermente süt	Val-Pro-Pro/ Ile-Pro-Pro	Kan basıncında azalma	Mizushima ve ark. (2004)
Dahi (Fermente süt)	β -CN; Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	Kan basıncında azalma	Ashar ve Chand (2004)

Bu ürünlerin Avrupa ve Amerika süt ürünleri/fonksiyonel gıdalar pazarındaki yerleri henüz çok sınırlıdır. Orta düzeyde hipertansif deneklerle yürütülen plasebo-kontrollü denemelerde, 4 hafta boyunca her gün 95 mL Calpis tüketen bireylerde kan basıncının önemli düzeyde düştüğü saptanmıştır. Bu denemede kullanılan ACE-inhibitör peptidlerin (VPP ve IPP) tüketim konsantrasyonları nispeten düşük olmasına karşı (2.6 mg gün^{-1}) etkisinin önemli olduğu görülmüştür (Hata ve ark., 1996; Yamamoto ve ark., 2003). Benzer sonuçlar, üst sınıra yakın düzeyde tansiyon hastası olan ve 4 hafta süre ile günde 160 g Calpis tüketen bireyler üzerinde gerçekleştirilen denemelerde de elde edilmiştir (Mizushima ve ark., 2004). Evolus[®] kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde ise 8 ve 21 hafta süre ile fermente süt tüketiminin orta düzeyde hipertansif bireylerde sırasıyla sistolik ve diastolik kan basıncını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Seppo ve ark., 2002, 2003). Geleneksel bir Hint içeceği olan Dahi'ye Ser-Lys-Val-Tyr-Pro (SKVYP) ilave edilerek üretilen fonksiyonel fermente içeceğin tüketimi ile birlikte (100 mL gün^{-1} , 4 hafta boyunca) sistolik kan basıncında belirgin azalmalar kaydedilmiştir (Ashad ve

Chand, 2004). VPP ve IPP içeren fermente sütlerin oral yolla uzun süreli tüketimine bağlı olarak SHR'lerde hipertansiyonun kontrol altında tutulabildiği ve VPP ile IPP üretiminde *Lb. helveticus* LBK-16H'nin etkili olduğu bulunmuştur (Hata ve ark., 1996; Sipola ve ark., 2001, 2002; Seppo ve ark., 2002, 2003). ACE inhibitör peptidlerin kan basıncını düşürme mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi ve uzun süreli fizyolojik etkilerinin net olarak ortaya konulabilmesi için daha fazla insan denemesine gereksinim bulunmaktadır.

2.5. Enterokokların Proteolitik ve Diğer Metabolik Aktiviteleri

Bazı enterokok suşları birçok süt ürününün doğal florasında yer almasına karşın (Giraffa ve ark., 1997), bir ya da daha fazla virülens faktörü barındırması nedeniyle gıda üretiminde kullanımı konusunda çekinceler bulunmaktadır (Franz ve ark., 1999; 2001). Bununla birlikte, virulent faktörün suşa bağımlı olduğu ve suş bazında patojenite testlerinin yapılarak enterokokların gıda sistemlerinde kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001).

Enterococcus spp.'ler genel olarak sindirim sisteminin doğal florasının bir üyesi ve fekal kontaminasyonun bir belirtisi olarak tanımlansa da, son yıllarda bazı enterokok suşlarının potansiyel probiyotik etki gösterdiği saptanmıştır (Franz ve ark., 1999; Gibson, 2002; Guslandi, 2003; Vael ve ark., 2002). Günümüzde enterokokları içeren eczacılık ürünlerinin insan klinik tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu preparatlar gastrointestinal dengeyi geliştirerek gastroenteritisin tedavisinde de kullanılmaktadır (Franz ve ark., 1999; Hugas ve ark., 2003). *Enterococcus* spp. içerisinde probiyotik özelliğe sahip suşları barındıran iki tür *Enterococcus faecium*

ve *Ent. faecalis*'tir (Birello ve ark., 2001; Klein ve ark., 1998). *Ent. faecium*'un insanlarda diyarenin tedavisinde (özellikle *Ent. faecium* SF68 suşu) (Bellomo ve ark., 1980; Franz ve ark., 1999; Flint, 2002), *Ent. faecalis*'in ise kolesterolün kana absorpsiyonunun engellemesinde (Saavedra ve ark., 2003) kullanımı bulunmaktadır. *Ent. faecium* SF68 suşu ilk kez İsveç'te geleneksel gıdalardan izole edilmiş ve İsviçre'de patent almıştır. Bu suşun özellikle diyareye karşı yüksek etkinliği kısa jenerasyon süresi (20 dakika) ve kısa başlangıç (lag) fazına sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Son yıllarda; enterokokların gıdaların organoleptik özelliklerine katkıda bulunması, patojenlere karşı bakteriyosin üretme yetenekleri ve potansiyel probiyotik özellikleri nedeniyle peynir başta olmak üzere değişik gıdalarda starter/ikincil starter olarak kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Holzapfel ve ark., 1998; Moreno ve ark., 2006). Geçmiş çalışmalarda *Ent. faecium* ilave edilerek üretilen fermente süt ürünlerinin tüketimi ile kısa vadede LDL kolesterol seviyesinde azalma meydana gelmekle birlikte uzun vadede LDL seviyesinde önemli düzeyde azalma oluşmadığı belirlenmiştir (Richelsen ve ark., 1996). Gardiner ve ark. (1999a) *Ent. faecium* PR88 kullanarak ürettikleri Cheddar peynirinin tüketimine bağlı olarak kolitis sendromlarının azaldığını ve peynirde duyusal özelliklerin geliştiğini saptamışlardır. *Ent. faecium* K77 Danimarka'da starter kültür olarak kullanımına izin verilen probiyotik karakterli bir suştur (Giraffa ve ark., 1997; Ross ve ark., 2002). *Ent. faecium*'un aktif kültür olarak kullanıldığı ticari bir ürün ise Causido® adı altında Kuzey Avrupa ülkelerinde pazara sunulmuştur (Lund ve ark., 2002).

Enterokoklar süt ürünleri içerisinde özellikle peynir mikroflorasında yaygın olarak yer almaktadır. Saavedra ve ark. (2003) geleneksel bir Arjantin peyniri olan Tafi peynirinden 122 adet *Ent. faecium* suşunu izole etmiş ve bu suşların virülans olmadığını ve 9 adedinin kolesterol düşürücü, 6 adedinin ise bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğunu belirlemiştir. Probiyotik ve/veya fonksiyonel özelliğe sahip enterokokların peynir başta olmak üzere süt ürünlerinin üretiminde kullanımına yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Gardiner ve ark., 1996b; Stanton ve Ross, 2000).

Ent. faecium ya da *Ent. faecium* içeren karışık kültürlerin kullanıldığı peynirlerde çok sayıda ACE inhibisyon aktivitesi gösteren peptid fraksiyonu bulunmakla birlikte bu peptidler düşük yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonuna sahiptir (IC_{50} ; $< 10 \mu g mL^{-1}$). Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonunun düşük olması inhibisyon etkinliğinin yüksek olması anlamına gelmektedir. Muguerza ve ark. (2006), çiğ sütten izole etikleri *Ent. faecalis* suşlarını kullanarak üretmiş oldukları fermente sütlerde, bu suşların potansiyel ACE inhibitörü aktivitesine sahip peptid oluşumunu sağladığını ve dolayısıyla anti-hipertansif etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar, geleneksel Meksika peynirlerinden izole edilen enterokok suşlarında da görülmüştür (Torres-Lianez ve ark., 2011).

Ent. faecalis CECT 5727, CECT 5728, CECT 5826 ve CECT 5827 suşları kullanılarak üretilen fermente süt rnlerinde IPP ve VPP oluşmadığı, ancak bu ürünlerde ACE inhibisyon aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur (Miguel ve ark., 2005). *Ent. faecalis*'in bu suşlarını içeren fermente sütlerin tüketimi ile akut hipertansif SHR'lerde kan basıncı düşerken, normal kan basıncına sahip Wistar-

Kyoto ratlarda kan basıncı değişimi olmadığı saptanmıştır (Miguel ve ark., 2005). İlgili çekici bir yaklaşım olarak, *Ent. faecalis* CECT 5728 ile fermente edilen sütlere kalsiyum (Ca) ilavesi ile anti-hipertansif etkinin güçlendiği grlmştır (Miguel ve ark., 2005). *Lb. helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilen sütlerde de benzer sonuçlar ile karşılaşılmıştır (Sipola ve ark., 2001). Mugureza ve ark. (2006) 4 farklı *Ent. faecalis* suşunun ACE inhibitör aktivitesinin *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* ve *Lc. lactis* subsp *cremoris*'den daha yüksek olduğunu bulmuştur (yaklaşık IC₅₀ değerleri 34-59 µg mL⁻¹ arasındadır).

BÖLÜM III

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Yağsız UHT süt

Yağsız taze UHT süt Pınar Süt A.Ş.'den (Pınarbaşı, İzmir) temin edilmiştir.

3.1.2. Bakteri suşları ve gelişim koşulları

Çalışmada, *Enterococcus faecalis* (6 suş) ve *Enterococcus faecium*'un (15 suş) geleneksel Urfa peynirinden izole edilen toplam 21 suşu kullanılmıştır. İzole suşlar Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ile Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden sağlanmıştır. Kullanılan enterokok izolatlarının % nükleotid dizi benzerliği ve nükleotid dizi numaraları Çizelge 3.1.'de verilmektedir.

3.1.3. Kimyasal malzemeler

Tüm kimyasal malzemeler SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Münih, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan enterokok izolatlarının suş yakınlığı ve % nükleotid benzerlikleri.

İzolat no	En yakın komşu	Yüzde nükleotid benzerliği	Nükleotid dizi erişim numarası
1	<i>Enterococcus faecium</i> Hwo5	%99	EU717959
3	<i>Enterococcus faecium</i> Cg05	%99	EU717959.1
4	<i>Enterococcus faecium</i> HN-F23	%97	FJ378708.2
5	<i>Enterococcus faecium</i> L3	%97	GQ267519.1
6	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	%97	DQ411813.1
7	<i>Enterococcus faecium</i> M3-1	%97	EU794733
15	<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2104	%97	EU003448.1
16	<i>Enterococcus faecium</i> CSI35MX	%97	FJ538584.1
20	<i>Enterococcus faecium</i> IMAU10052	%98	FJ915708
21	<i>Enterococcus faecium</i> HN-F22	%96	FJ378707
22	<i>Enterococcus faecium</i> CSI36MX	%97	FJ538584.1
29	<i>Enterococcus faecium</i> SH 632	%98	EU003448.1
61	<i>Enterococcus faecium</i> IMAU60169	%94	FJ749883.1
71	<i>Enterococcus faecium</i> R8	%99	EU483112.1
73	<i>Enterococcus faecalis</i> KLDS0.0341	%96	GQ337884.1
78	<i>Enterococcus faecalis</i> IMAU10130	%99	FJ915786.1
80	<i>Enterococcus faecalis</i> XR7	%96	EU708623.1
81	<i>Enterococcus faecalis</i> IMAU40046	%99	FJ749321.1
106	<i>Enterococcus faecium</i> HN-N26	%93	FJ378681.1
139	<i>Enterococcus faecalis</i> IMAU70122	%96	GQ131238.1
140	<i>Enterococcus faecalis</i> IMAU70078	%96	GQ131194.1

Kaynak: Kırmacı (2010)

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri aktivasyonu

Denemede kullanılan bakteriler önce MRS Broth içerisinde aktive edilmişlerdir. Aktivasyon işlemi 37 °C’de 18 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. 18 saatlik inkübasyon sürecinin sonunda tüm sıvı besiyerlerinde yer alan bakteriler 14.000 rpm’de 4 °C’de 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir (Sigma 16-2K, Sigma Co., St Louis, MO, ABD). Elde edilen pellet üzerine steril ¼ Ringer çözeltisi ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Üç defa tekrar eden yıkamanın ardından Ringer çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık 10^8 kob mL⁻¹ düzeyinde bakteri UHT sterilize sültere inoküle edilmiş ve 37 °C’de pH 4.5’e kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında UHT sül örneklerinin pH değeri 1 N NaOH yardımıyla pH 5.2’ye ayarlanmış, %2 trisodyum sitrat ilave edildikten sonra çözeltinin dengeye gelmesi için 10 dakika süre ile beklenilmiştir. Daha sonra bakteriler 3700 x g’de 4 °C’de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek ayrılmış ve 30 mM Tris-maleat tamponu (pH 7.5) ile üç kez yıkandıktan sonra aynı tampon içerisinde yeniden suspanse edilmiştir (Robert ve ark., 2004). Bu yolla aktive edilen bakteriler hidrolizasyon denemelerinde kullanılmıştır.

3.2.2. UHT sül hidrolizasyonu

UHT sülter son bakteri konsantrasyonu 8×10^9 kob mL⁻¹ olacak şekilde ayrı ayrı *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşları ile inoküle edilmiştir. Örnekler 30 °C’de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon periyodunun

sonunda ACE inhibisyon aktivitesi ölçümü için örnek alınmıştır. Fermente sütler daha sonra 4 °C’de 30 gün boyunca depolanmış ve depolama periyodu sonunda ACE inhibisyon aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.3. Angiotensin (ACE) inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi

Angiotensin-inhibisyon aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ekstrakt (suda çözünen ekstrakt) Donkor ve ark. (2007)’ye göre hazırlanmıştır. Buna göre; 10 mL fermente süt örneği 10 mL su ile karıştırılarak bir ultraturrax homojenizatör yardımı ile 2 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Ardından, karışım 4 °C’de 20 dakika süre ile 4000 x g’de santrifüj edilmiş, santrifüj sonrasında santrifüj tüpünün alt (kazeince yoğun kısım) ve üst (yağca yoğun kısım) kısmı arasında kalan sıvı Whatman 41 filter kağıdı yardımı ile süzölmüştür. Filtrat bir kez daha 4000 x g’de (4 °C’de 20 dakika süre ile) santrifüj edildikten sonra cam yününden geçirilerek berrak bir sıvı (suda çözünen ekstrakt, WSE) elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt -80 °C’de saklanmıştır.

Dondurulmuş WSE’de ACE-inhibisyon aktivitesi belirlenmesinde Cushman ve Cheung (1971) tarafından geliştirilen ve Gomez-Ruiz ve ark. (2002) tarafından modifiye edilen spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Analiz yöntemi hippuryl-histidyl-leucine (HHL)’den ACE katalizörlüğünde hippurik asit oluşumu temeline dayanmaktadır. Deneyde kullanılan reaksiyon karışımı 200 µL HHL çözeltisi (3.8 mmol L⁻¹ HHL, 100 mmol L⁻¹ sodyum borat tamponu, 300 mmol L⁻¹ NaCl, pH 8.3), 2 mU ACE (tavşan akciğeri kökenli) ve 35 µL örnek çözeltisi içermektedir. Karışım 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 150 µL 1 M HCl yardımıyla durdurulmuştur. Oluşan hippurik asit 1.7 mL etil asetat yardımı ile ekstrakte edilmiş

ve karışım sentrifüj edildikten sonra 1.5 mL organik faz (etil asetat) yeni bir test tüpüne aktararak 100 °C’de su banyosunda 15 dakika süre ile etil asetat evapore edilmiştir. Evaporasyon sonunda kalıntı, 1 mL deiyonize su içerisinde çözündürülmüş ve 228 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okuma yapılmıştır. İnhibisyon oranı (%) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$\text{ACE-inhibisyon oranı (\%)} = [1 - (A - C) / (B - D)] \times 100$$

A: ACE, HHL ve ACE-inhibitörü varlığındaki absorbans

B: ACE ve HHL varlığında ve ACE-inhibitör yokluğundaki absorbans

C: HHL ve ACE-inhibitör varlığında ve ACE yokluğundaki absorbans

D: HHL varlığında ve ACE ile ACE-inhibitörü yokluğundaki absorbans

ACE-inhibisyon aktivitesi ayrıca IC₅₀ oranı (ACE’nin en az %50’sini inhibe edebilecek biyo-aktif peptid düzeyi) ile de ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri, farklı protein konsantrasyonlarına karşı ACE-inhibisyon değerlerinin grafik üzerinde ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. ACE-inhibisyonu ile protein konsantrasyonu arasındaki korelasyonu saptamak için her bir örnek 3 farklı protein konsantrasyon seviyesine ayarlanmış (%1, %2 ve %3), ardından, IC₅₀ değerleri ACE aktivitesinin %50’sinin inhibe olduğu protein konsantrasyonundaki lineer regresyon kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Proteolitik aktivitenin belirlenmesi

Bakteri suşlarının proteolitik aktiviteleri OPA (*o*-phthaldialdehyde) metodu uyarınca serbest NH₃ grupları konsantrasyonunun ölçümü esasına göre belirlenmiştir (Donkor ve ark., 2007). Buna göre; 2.5 mL örnek 5 mL %0.75'lik triklorasetikasit (TCA) ile karıştırıldıktan sonra Advantec 231 filtre kağıdından süzölmüştür. 150 µL filtrat üzerine 3 mL OPA çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında (~20 °C) 2 dakikalık inkübasyonun ardından çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 340 nm'de okunmuştur.

3.2.5. Teknolojik parametreler

Depolama süresi boyunca her 5 günde bir örnek alınarak aşağıda belirlenen kimyasal özellikler bakımından analiz edilmiştir.

3.2.5.1. Bakteri gelişimi

Tüm örneklerde aktivasyon sürecinin başında ve sonunda (48 saat sonunda) toplam enterokok sayıları Kanamycin Esculin Agar aracılığı ile belirlenmiştir (37 °C'de 48 saat). (Klein ve ark., 1998). Aktivasyonu takiben tüm örneklerde hidrolizasyon sürecinde enterokok sayıları aynı yöntemle 24 saatlik intervaller ile izlenmiştir. Ayrıca, fermentasyon sonunda 30 gün depolanan örneklerde de her 15 günde bir bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir. Bakteri sayıları koloni oluşturan birim (kob/mL) olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.2. pH ve titrasyon asitliği gelişimi

pH ölçümlerinde bileşik elektrodlu dijital pH-metre kullanılmıştır (20 °C). Titrasyon asitlik ölçümü ise Anonim (1981)'e göre % Laktik asit olarak belirlenmiştir.

3.2.5.3. SDS-PAGE profillerinin belirlenmesi

Fermente süt örneklerinde depolama süresince proteolitik gelişimin ölçümünde SDS-PAGE jel elektroforez tekniğinden yararlanılmıştır (Özer, 1997). Buna göre; 1 mL fermente süt örneği 2 mg mL⁻¹ protein konsantrasyonu elde edilecek şekilde destile su ile dilüye edilmiş ve ardından dilüye edilmiş fermente süt örneği 1 mg mL⁻¹ protein oranını elde edebilmek amacıyla 1:1 oranında örnek tamponu ile karıştırılmıştır. Proteoliz ürünlerin molekül ağırlıkları ve elektrik yüklerine göre ayrışmalarının sağlandığı ayırıcı jel konsantrasyonu %12.5 (BioRad) olarak belirlenmiştir. Ayırıcı ve yoğunlaştırıcı jel çözeltileri aşağdaki şekilde hazırlanmıştır:

Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi: 29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid destile su içerisinde çözündürölmüş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzüldükten sonra çözelti 4 °C'de en fazla 1 hafta saklanmıştır.

Ayırıcı (separating) jel tamponu: 36.3 g Tris base 100 mL destile su içerisinde çözündükten sonra pH 1 M HCl ile 8.8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim 200 mL'ye tamamlandıktan sonra çözelti en çok 1 hafta süre ile 4 °C'de saklanmıştır.

Yoğunlaştırıcı (stacking) jel tamponu: 6 g Tris 40 mL destile su içerisinde çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra en çok 1 hafta süre ile 4 °C'de saklanmıştır.

Örnek tamponu: 1.5 g Tris, 2 g SDS, 2 mg bromfenol mavisi 60 mL destile su içinde çözüldükten sonra üzerine 10 mL gliserol ilave edilmiştir. Karışımın pH'sı 1 M HCl ile 6.8'e ayarlanmış, ardından 2 mL 2-β-merkaptoetanol katılıp tekrar pH kontrolü yapılmıştır. Çözeltinin son hacmi 100 mL olarak ayarlanmıştır.

Elektrod tamponu: 30 g Tris base, 144 g glisin ve 10 g SDS destile su içerisinde çözüldükten sonra hacim 2 L'ye tamamlanmıştır. Stok çözelti 4 °C'de depolanmış ve presipitasyon görülmesi durumunda 37 °C'yi geçmeyecek şekilde ısıtılarak partiküllerin çözünmesi sağlanmıştır. Kullanım önce elektrod tamponu 1:5 oranında seyreltilmiştir.

%10 amonyum persülfat : Günlük olarak taze; %10 SDS ise haftalık olarak taze hazırlanmıştır.

Jelin yürütülmesinde Bio-Rad marka mini jel elektroforez düzeneği kullanılmıştır (Bio Rad Laboratories, Hertfordshire, İngiltere). Elektroforez cihazı 210 Volt sabit voltaj altında çalıştırılmıştır. Cihaza yüklenen örnek miktarı 20 µL olarak belirlenmiştir.

Ayırıcı (separating) jel çözeltisi
(%12.5 monomer konsantrasyonu)

Akrilamil stok çözeltisi	4.17 mL
Ayırıcı jel tamponu, pH 8.8	2.5 mL
Destile su	3.18 mL
%10 sodyum dodesil sülfat (SDS)	0.10 mL
Amonyum persülfat	50 µL
TEMED	5 µL

Yoğunlaştırıcı (stacking) jel çözeltisi
(%4 monomer konsantrasyonu)

Akrilamil stok çözeltisi	0.65 mL
Yoğunlaştırıcı jel tamponu, pH 6.8	1.25 mL
Destile su	3.05 mL
%10 sodyum dodesil sülfat (SDS)	0.05 mL
Amonyum persülfat	25 µL
TEMED	5 µL

Commasie Brilliant Blue G-250

Boya Çözeltisi

Coommasie Brilliant Blue	1 g
Metanol	400 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Destile su	500 mL

Boya Geri Alma Çözeltisi

Metanol	400 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Destile su	500 mL

BÖLÜM IV

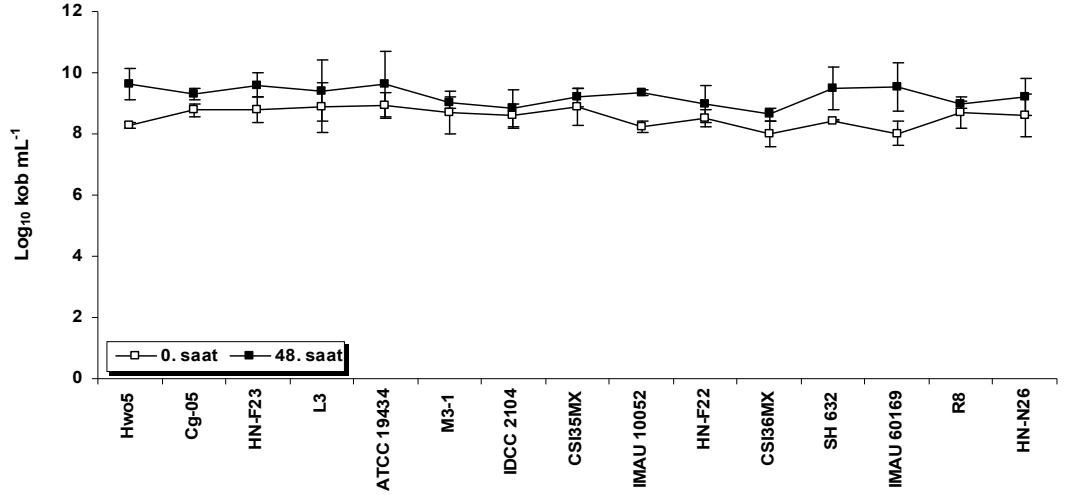
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Enterococcus faecium* ve *Ent. faecalis* Suşlarının Aktivasyonu

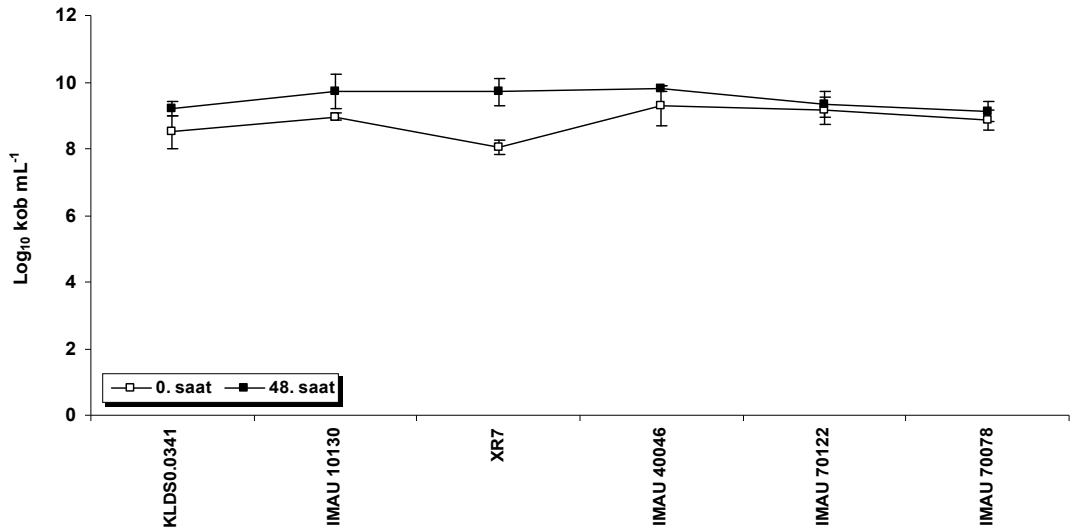
Ent. faecium ve *Ent. faecalis* suşlarının aktivasyonunda UHT süt kullanılmıştır. 37 °C’de 48 saat süren aktivasyon periyodu boyunca bakterilerin koloni sayılarında meydana gelen değişimler Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur. Aktivasyon sürecinin başlangıcında *Ent. faecium* koloni sayıları 8.00-9.29 log₁₀ kob mL⁻¹ arasında değişirken *Ent. faecalis* koloni sayıları 8.00-8.95 log₁₀ kob mL⁻¹ aralığında yer almıştır. Aktivasyon süreci boyunca tüm suşların koloni sayılarında kısmi bir artış kaydedilmiştir. En belirgin artış *Ent. faecium* Hwo5, IMAU 10052, SH 632, IMAU 60169 ile *Ent. faecalis* XR7 suşlarında görülmüştür. 48 saat sonunda aktivasyon ortamı olarak kullanılan UHT sütlerin pH’sı 1 N NaOH yardımıyla 5.2’ye ayarlanmış ve ardından %2 trisodyum sitrat ilave edilmiştir. Daha sonra bakteriler santrifüj yoluyla ayrılmış ve 30 mM Tris-Maleat tamponu ile yıkanarak hidrolizasyon çalışmaları için hazır duruma getirilmiştir.

Ent. faecalis ve *Ent. faecium* 10 ve 45 °C’de gelişebilme ve %6.5 NaCl, pH 9.6 ve 60 °C’de 30 dakika ısıtma işlem koşullarına direnç gösterme yetenekleri ile diğer Gram-pozitif / katalaz-negatif koklardan ayrılmaktadır (Flint, 2002). Her iki bakteri

de uygun ortam bulduklarında kolaylıkla gelişim gösterebilmektedir. Örneğin; peynir telemesinde 10^4 - 10^6 kob g^{-1} dolayında olan bakteri sayısı peynir olgunlaşması sırasında 10^5 - 10^7 kob g^{-1} düzeyine çıkabilmektedir (Flint, 2002).



Şekil 4.1. 37 °C’de 48 saat süre ile UHT süt içerisinde aktive edilen *Ent. faecium* suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler (n=2).

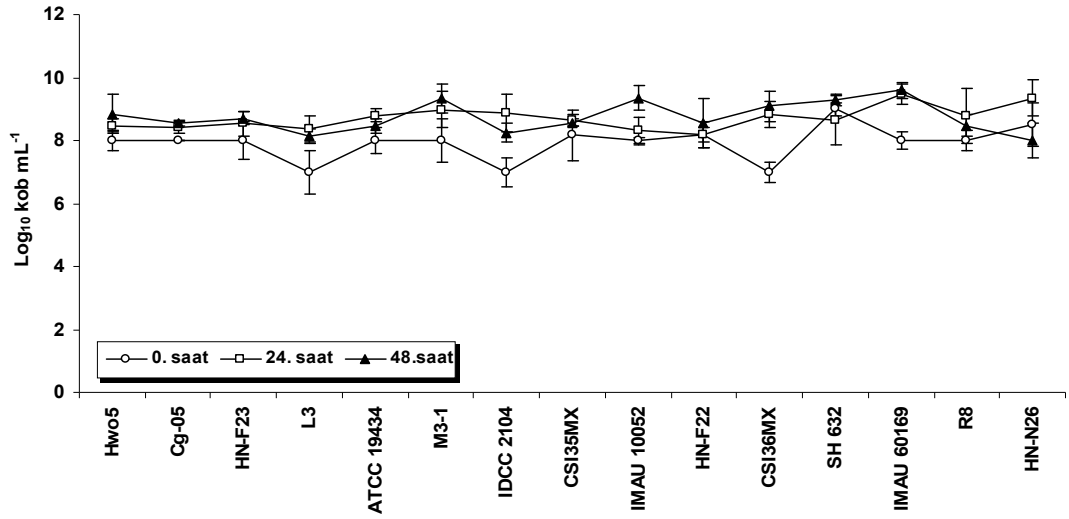


Şekil 4.2. 37 °C’de 48 saat süre ile UHT süt içerisinde aktive edilen *Ent. faecalis* suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler (n=2).

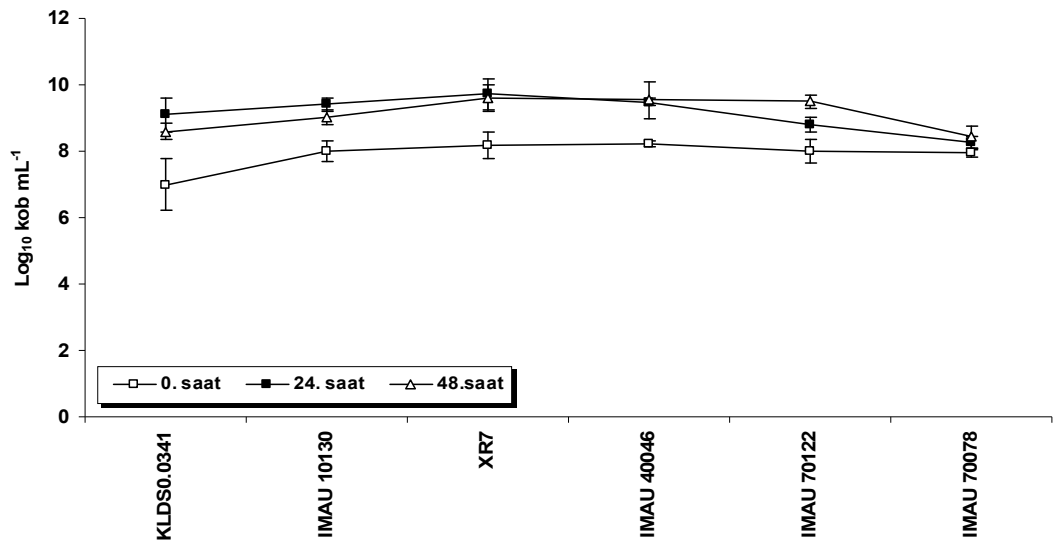
4.2. Hidrolizasyon Sürecinde *Enterococcus faecium* ve *Ent. faecalis* Suşlarının Koloni Sayılarında Meydana Gelen Değişimler

Deneme kapsamında *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* suşlarının ACE inhibitör peptid oluşturma düzeyleri ile koloni sayıları arasında bir ilişkinin oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla UHT sütün 30 °C’de 48 saat süre ile hidrolizasyonu sırasında koloni sayılarında meydana gelen değişimler 24 saatlik intervaller ile izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.3. ve 4.4.’de sunulmuştur.

Genel olarak; hidrolizasyon süreci boyunca her iki bakteriye ait suşların koloni sayılarında artış kaydedilmiştir. Özellikle, *Ent. faecium* L3, IDCC 2104 ve CSI36MX suşlarının koloni sayılarında hidrolizasyon ilk 24 saati içerisinde belirgin bir artış kaydedilmiş (1.35-1.88 log₁₀’luk artış) ancak 24. ve 48. saatler arasında koloni sayıları bakımından iki suş hariç (IMAU 10052 ve HN-N26) bariz bir farklılık gözlenmemiştir. Bazı suşlarda hidrolizasyonun 48. saat sonunda koloni sayıları 24. saatteki koloni sayılarının altına düşmüştür (L3, ATCC 19434, IDCC 2104, R8 ve HN-N26) (Şekil 4.3.). *Ent. faecalis*’in hidrolizasyon sürecinde daha stabil bir gelişim eğilimi gösterdiği saptanmıştır. Genel olarak, ilk 24 saat içerisinde IMAU 70078 suşu hariç tüm *Ent. faecalis* suşlarında koloni sayıları belirgin bir artış göstermiştir. Hidrolizasyon süreci boyunca *Ent. faecalis* IMAU 70078 koloni sayılarındaki değişim çok sınırlı kalmıştır (0.48 log₁₀ kob mL⁻¹). Bununla birlikte, iki suşun (KLDSO.0341 ve IMAU 10130) koloni sayıları 48 saat sonunda kısmi bir azalma gösterirken, iki suşa (XR7 ve IMAU 40046) 24. ve 48. saatler arasında bakteri sayısında değişim kaydedilmemiştir.



Şekil 4.3. 30 °C’de 48 saat süre ile hidrolize edilen UHT sütlerde *Ent. faecium* suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler (n=2).



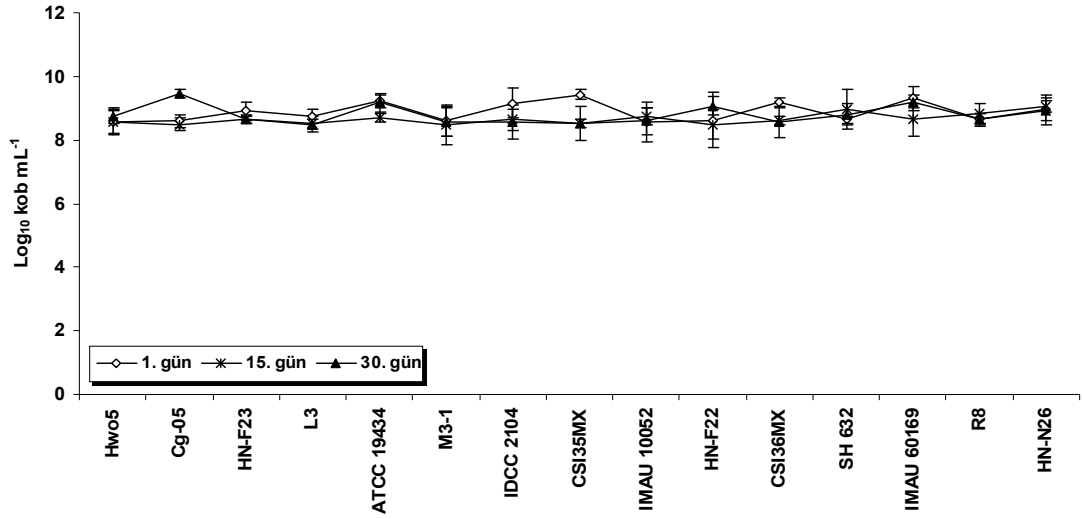
Şekil 4.4. 30 °C’de 48 saat süre ile hidrolize edilen UHT sütlerde *Ent. faecalis* suşlarının koloni sayılarında meydana gelen değişimler (n=2).

4.3. Depolama Sürecinde *Enterococcus faecium* ve *Ent. faecalis* Suşlarının Koloni Sayılarında Meydana Gelen Değişimler

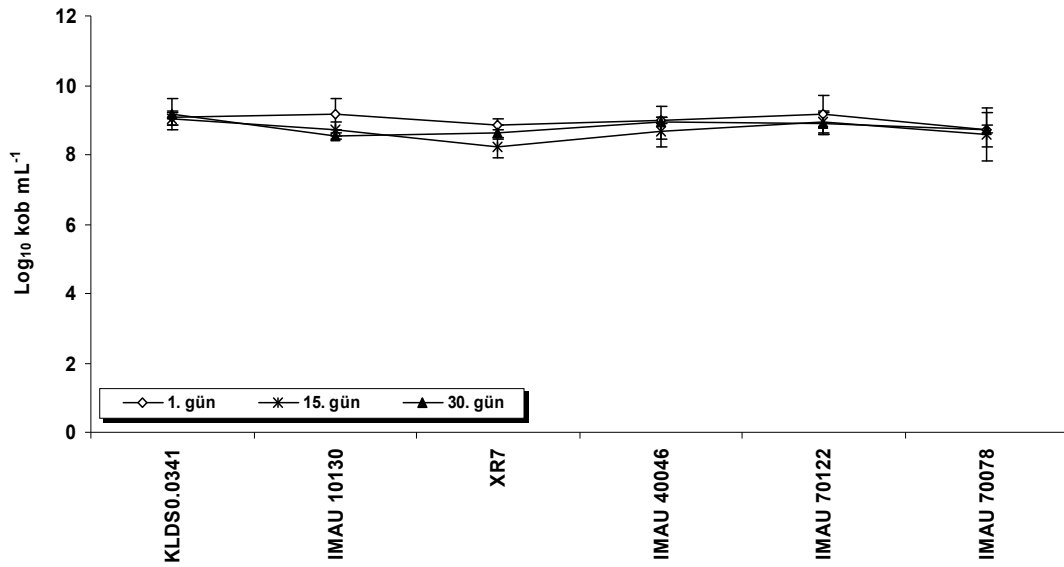
Fermente UHT süt örnekleri 30 gün boyunca 4 °C’de depolanarak depolama sürecinde bakteri sayılarındaki değişimler izlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5 ve 4.6). İlgili şekillerden de görülebildiği gibi deneme kapsamında analiz edilen suşların büyük bölümünde depolama süresi boyunca koloni sayıları önemli bir değişime uğramamıştır. Yalnızca *Ent. faecium* IDCC 2104, CSI35MX ve CSI36MX suşlarının koloni sayıları depolamanın birinci gününden sonra 0.50-0.91 log₁₀’luk bir azalma göstermiştir. *Ent. faecium* koloni sayıları depolamanın birinci gününde 8.55-9.42 log₁₀ kob mL⁻¹ arasında değişirken bu değerler 15. günde 8.46-9.04 log₁₀ kob mL⁻¹, 30. günde ise 8.49-9.45 log₁₀ kob mL⁻¹ aralığında seyretmiştir. *Ent. faecalis* suşlarının soğuk depolama sürecinde göstermiş olduğu gelişim eğilimleri de *Ent. faecium* suşlarına benzer bulunmuştur (Şekil 4.6.). Genel olarak, tüm *Ent. faecalis* suşlarında kolon sayıları depolama sürecinde önemsiz değişimler göstermiştir. Depolama sürecinin başlangıcında 8.74-9.17 log₁₀ kob mL⁻¹ aralığında yer alan koloni sayıları 30. gün sonunda 8.54-9.17 log₁₀ kob mL⁻¹ aralığında bulunmuştur.

4.4. pH ve Titrasyon Asitliği Değerleri Değişimleri

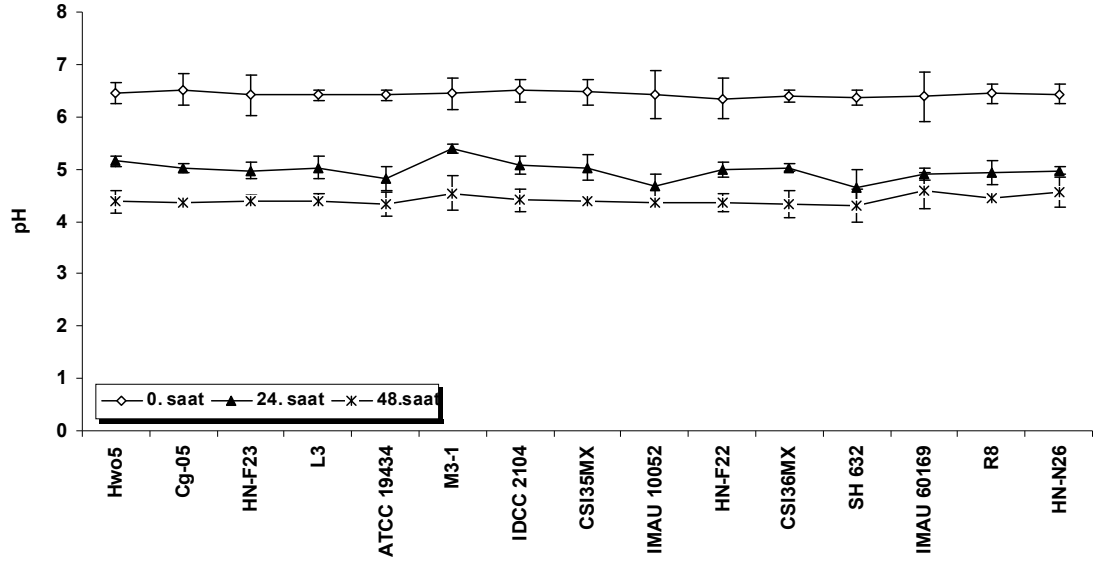
UHT sütlerin hidrolizasyon sürecinde pH değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.7. ve 4.8.’de sunulmaktadır. Genel olarak, pH değişimlerinin suşa bağımlı bir karakter göstermediği saptanmıştır. Fermente süt örneklerinin pH değerleri hidrolizasyon periyodunun ilk 24 saati içerisinde daha hızlı azalırken



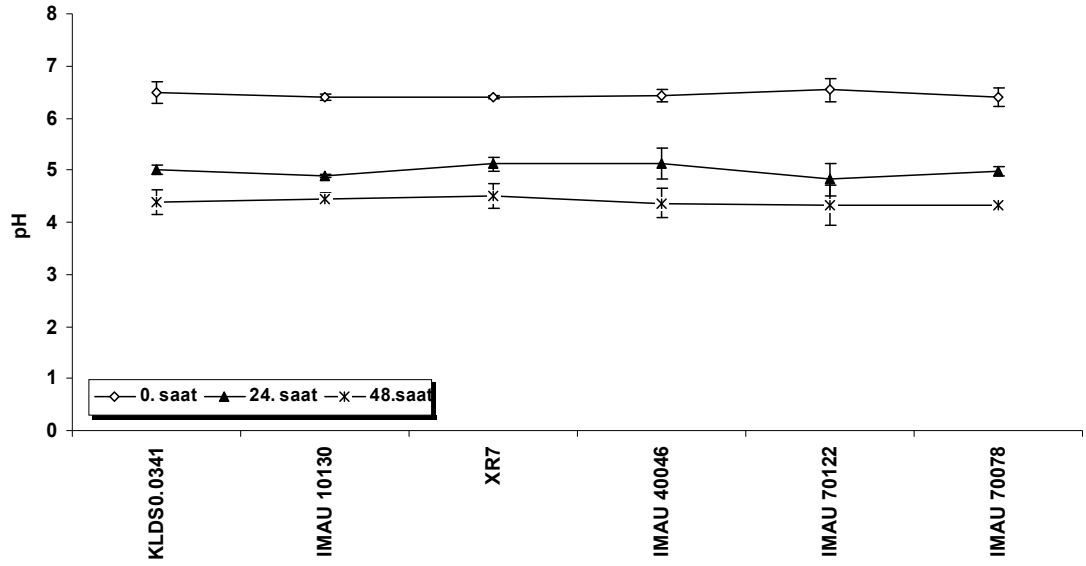
Şekil 4.5. *Ent. faecium* koloni sayılarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).



Şekil 4.6. *Ent. faecalis* koloni sayılarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).



Şekil 4.7. *Ent. faecium* ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde pH değişimleri (n=2).



Şekil 4.8. *Ent. faecalis* ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde pH değişimleri (n=2).

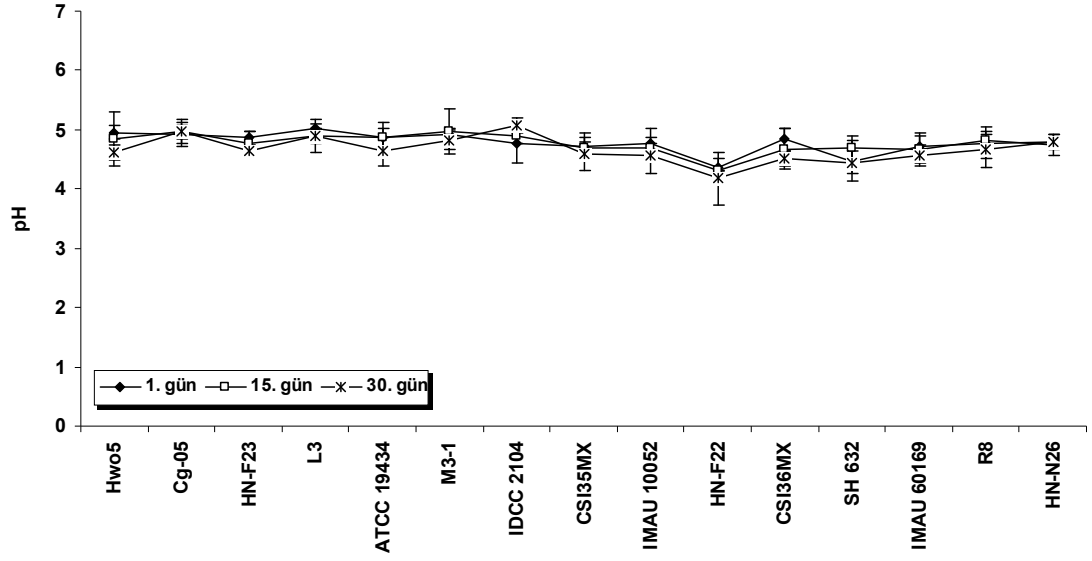
daha sonra yavaş ancak kararlı bir azalma eğilimi göstermiştir. Hem *Ent. faecium* hem de *Ent. faecalis*'in değişik suşları ile inoküle edilen UHT sütlerin pH değerleri 48 saat sonunda 4.31-4.59 aralığında yer almıştır. *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium*'un asidifikasyon yetenekleri konusunda çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu iki türe ait suşların ortak özelliği yavaş asit üreticisi olmalarıdır (Quiros ve ark., 2007). Kırmacı (2010) ise geleneksel Urfa peynirinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un değişik suşları ile 37 °C'de 6 saat süre ile inkübe edilen UHT sütlerin pH'larının 5.4-6.0 aralığında yer aldığını saptamıştır. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen enterokokların teknolojik özelliklerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise 35 enterokokal suştan 9'unun düşük asidifikasyon yeteneğine sahip olduğu ve bu suşların *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* ve *Ent. durans* türlerine ait olduğu belirlenmiştir (Arana ve ark., 2003). Sarantinopoulos ve ark. (2001) süt ürünleri ve insan kökenli 129 enterokok suşunun teknolojik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında yalnızca *Ent. faecalis* türüne ait 3 adet suşun UHT sütün pH'sını 6 saat içerisinde 5.9'un altına düşürebildiğini, 16 saatlik inkübasyon sonunda da 129 suşun sadece 21'inin pH'yı 5.0'ın altına indirebilme yeteneğini gösterdiğini saptamıştır. Aynı araştırmacılar, analiz edilen suşlar içerisinde *Ent. faecalis*'e ait suşların daha hızlı asit üretebildiklerini bulmuştur. *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium*'un koyun ve keçi sütlerinde laktozu, zayıf asit üretme yeteneğine sahip *Lb. paracasei*'den bile daha yavaş hidrolize edebildiği bulunmuştur (Freitas ve ark., 1999). Konu ile ilgili daha sistematik bir çalışmada 60 *Ent. faecalis* ve 24 *Ent. faecium* suşunun 37 °C'de 6 saat sonunda asit üretim yetenekleri incelenmiş ve suşların büyük çoğunluğunun pH'yı sadece 0.4-0.8 birim düşürebildiği görülmüştür (Villani ve Coppola, 1994). *Ent. faecalis* ile *Ent. faecium* arasında bir karşılaştırma

yapıldığında ise *Ent. faecalis*'in kısmen daha iyi bir asit geliştirici olduğu konusunda görüş birliği bulunmaktadır (Suzzi ve ark., 2000; Villani ve Coppola, 1994).

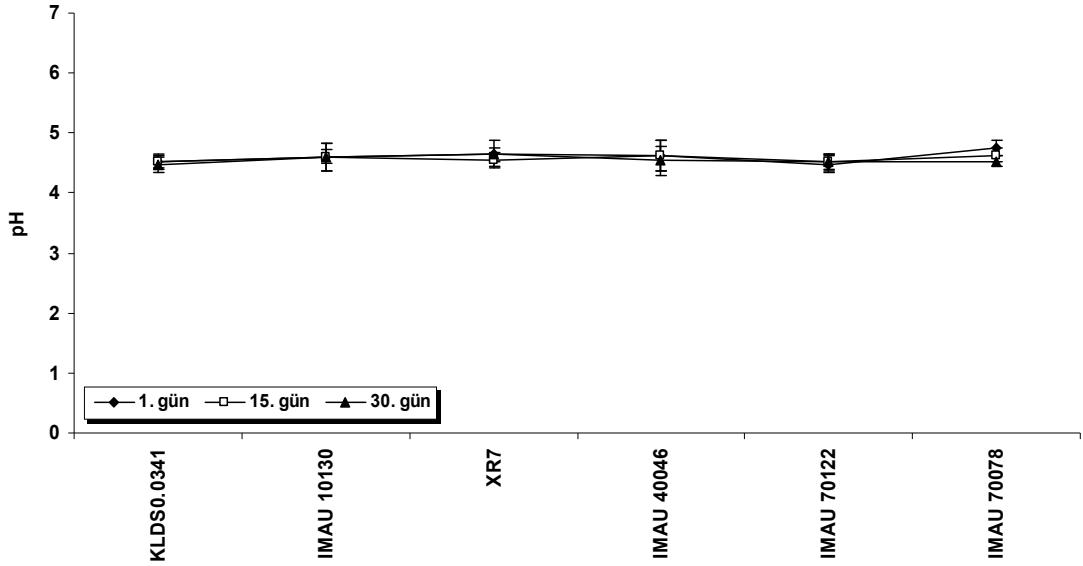
Depolama periyodunda fermente sütlerin pH değişimleri incelendiğinde (Şekil 4.9. ve 4.10.) hidrolizasyon sürecinde oluşan eğilimin değişmediği görülmektedir. Gerek *Ent. faecium* gerekse *Ent. faecalis* türüne ait suşların soğuk koşullarda çok zayıf bir asidifikasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

pH değişimlerine benzer şekilde her iki enterokok türüne ait suşların hidrolizasyon aşamasında asidifikasyon yeteneklerinin de nispeten sınırlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.11 ve 4.12.). Asidifikasyon tüm suşlar için hidrolizasyonun ilk 24 saati içerisinde hızlı gelişirken ilerleyen evrelerde laktik asit konsantrasyonlarının artış hızında yavaşlama kaydedilmiştir. Hidrolizasyonun başlangıcında suşlar arasında asidifikasyon yetenekleri bakımından önemli bir farklılık oluşmazken 24. saatte *Ent. faecium* M3-1 suşunun en düşük, IMAU 10052 ile SH 632 suşlarının ise en yüksek laktik asit konsantrasyonuna sahip suşlar olduğu görülmüştür (Şekil 4.11.). Hidrolizasyonun 48. saatinde de benzer bir eğilim kaydedilmiştir. *Ent. faecalis* suşları arasında da laktik asit üretim kapasiteleri bakımından önemli bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.12.).

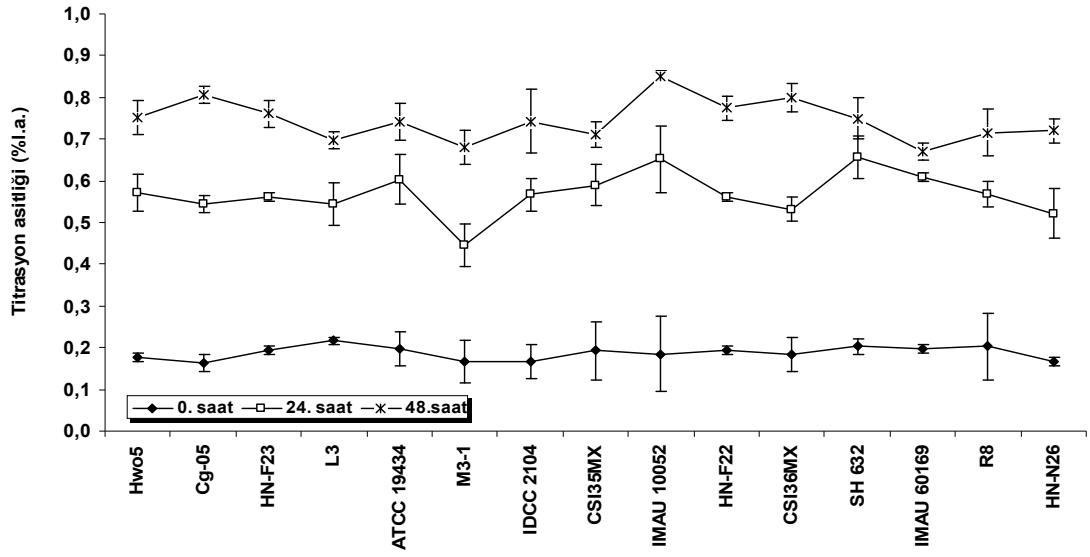
Depolama süresi boyunca tüm fermente süt örneklerinde laktik asit konsantrasyonları sınırlı ancak kararlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.13 ve 4.14.).



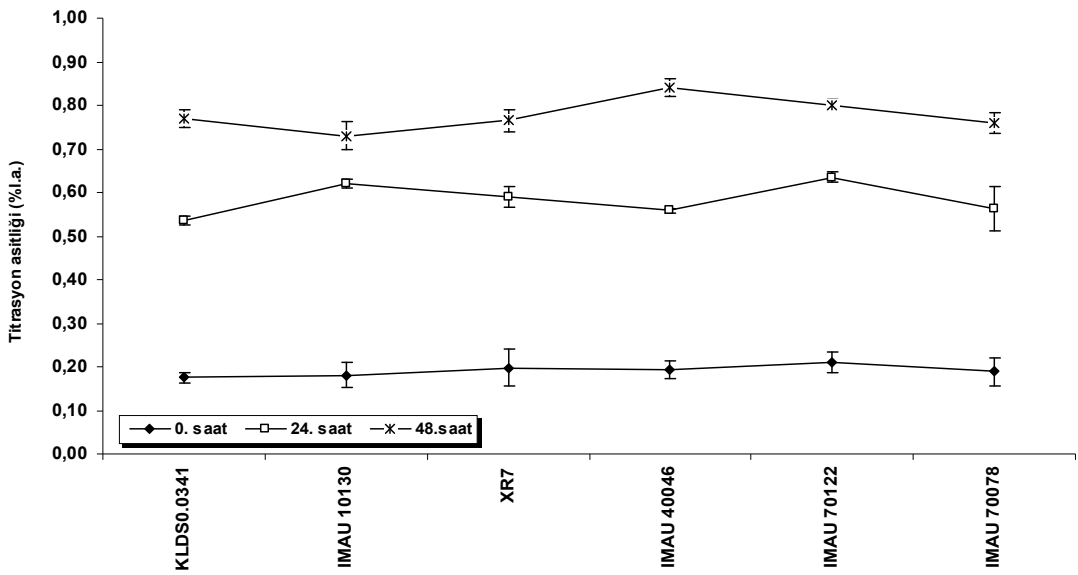
Şekil 4.9. *Ent. faecium* ile inoküle edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde pH değişimleri (n=2).



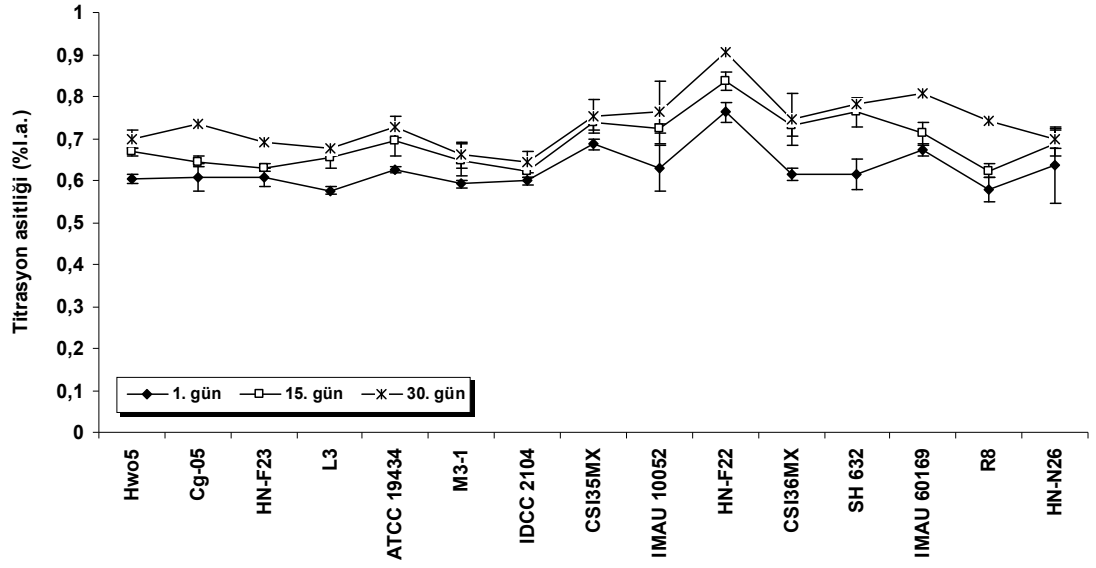
Şekil 4.10. *Ent. faecalis* ile inoküle edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde pH değişimleri (n=2).



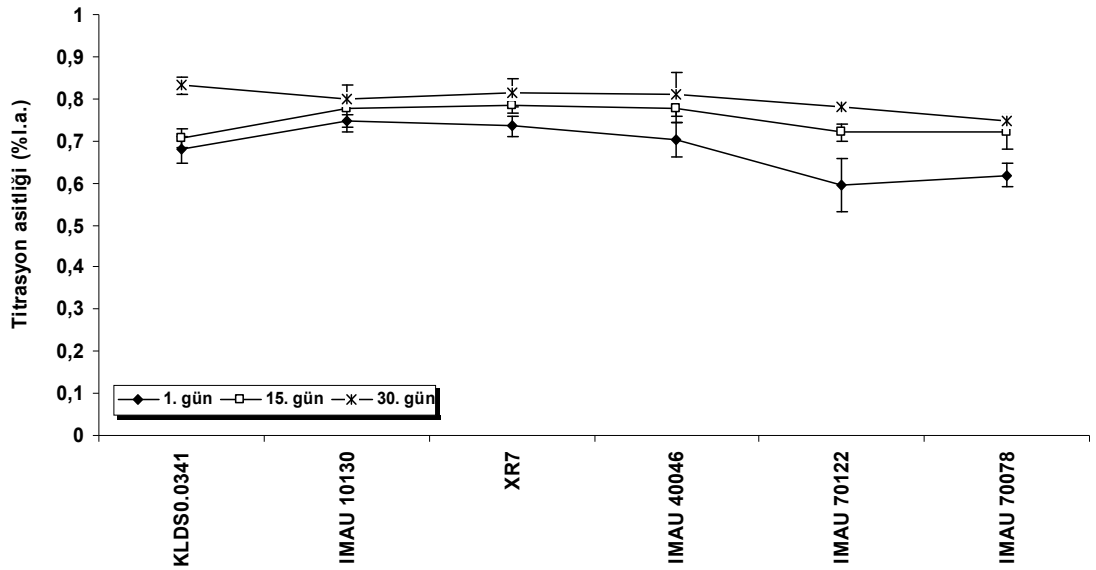
Şekil 4.11. *Ent. faecium* ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde laktik asit (%) değişimleri (n=2).



Şekil 4.12. *Ent. faecalis* ile hidrolize edilen UHT sütlerde hidrolizasyon sürecinde laktik asit (%) değişimleri (n=2).



Şekil 4.13. *Ent. faecium* ile hidrolize edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde laktik asit (%) değişimleri (n=2).

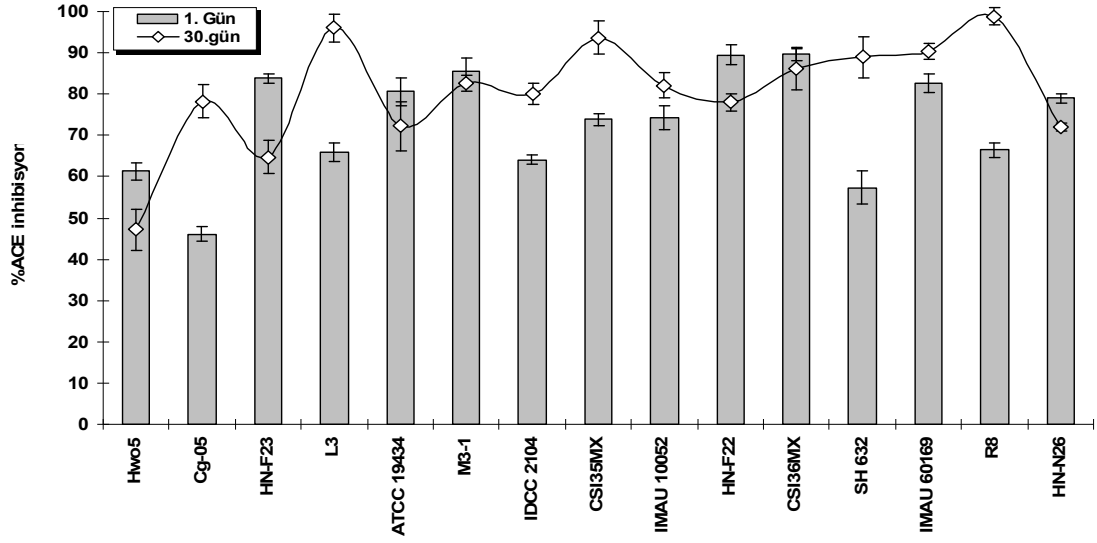


Şekil 4.14. *Ent. faecalis* ile hidrolize edilen UHT sütlerde 30 günlük depolama sürecinde laktik asit (%) değişimleri (n=2).

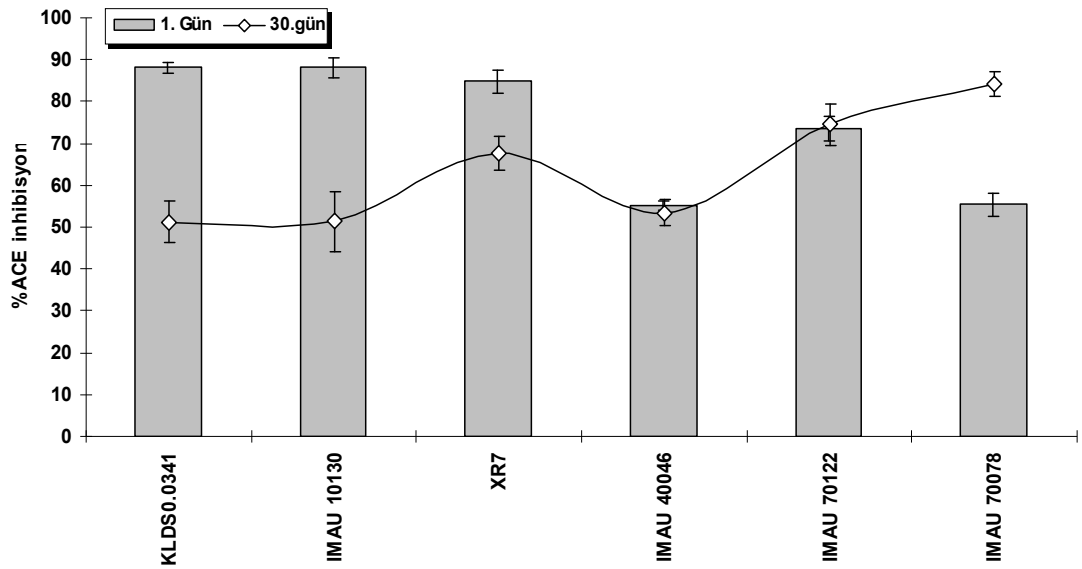
Ent. faecium HN-F22 depolama süresi boyunca en yüksek laktik asit üreten suş olurken *Ent. faecium* IDCC 2104 en zayıf asit üreticisi olarak belirlenmiştir. Depolamanın başlangıcında *Ent. faecalis* IMAU 70122 ve IMAU 70078 en zayıf asit üreticisi konumunda iken depolamanın 15. ve 30. günlerinde *Ent. faecalis* suşları arasında laktik asit üretimi bakımından belirgin bir fark kaydedilmemiştir. Delgado ve ark. (2002) 29 laktokok ve 10 enterokok suşunun laktik asit üretim yeteneklerini incelediği araştırmalarında suşların laktik asit üretimleri ile proteolitik aktiviteleri arasında ilişki olduğunu ve proteolitik gücü yüksek olan suşların asit üretme yeteneklerinin de üstün olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, aynı araştırmacılar tüm suşların peynir yapımı için yeterli düzeyde laktik asit üretebildiklerini göstermiştir.

4.5. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) İnhibitör Peptid Konsantrasyonlarındaki Değişimler

Depolama sürecinin başlangıcında ve sonunda deneme örneklerinin ACE inhibitör peptid konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler Şekil 4.15-4.16'da, bakteri sayıları ile ilişkileri de Şekil 4.17.-4.20'de sunulmaktadır. *Ent. faecium* suşlarının depolamanın 1. gününde ACE inhibisyon değerlerinin % 57.34 ile % 89.61 arasında değiştiği ve yalnızca *Ent. faecium* Cg05 suşu ile fermente edilen örnekte ACE inhibisyon oranının % 50'nin altında kaldığı (% 46.31) bulunmuştur. *Ent. faecium* bakteri sayıları ile ACE inhibitör peptid konsantrasyonları arasında direkt bir ilişki bulunmadığı, bakteri sayıları arasında belirgin fark bulunmamasına karşın bazı suşların ACE inhibitör peptid oluşturma



Şekil 4.15. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin %ACE inhibisyon oranlarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).

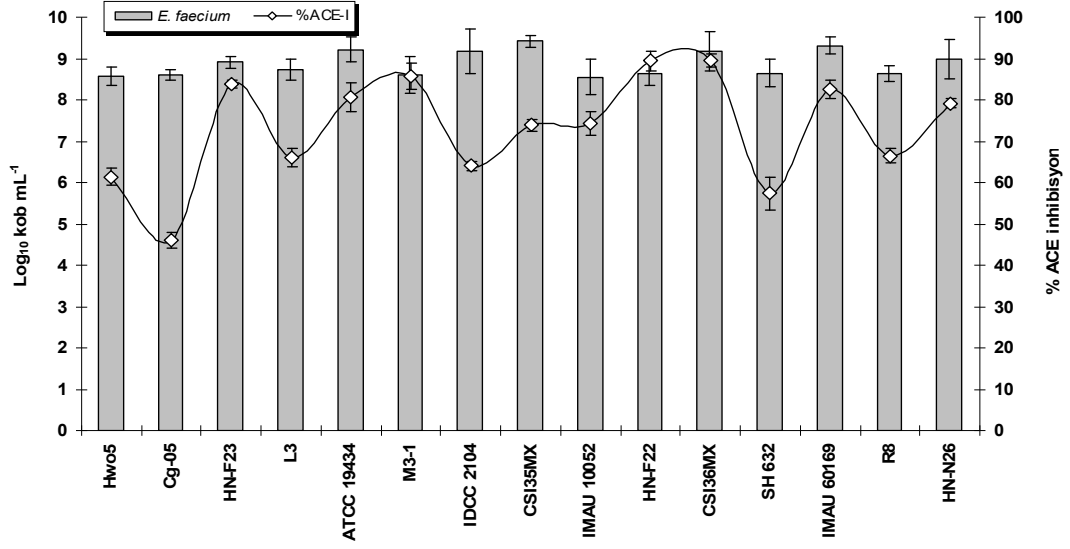


Şekil 4.16. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin %ACE inhibisyon oranlarında 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).

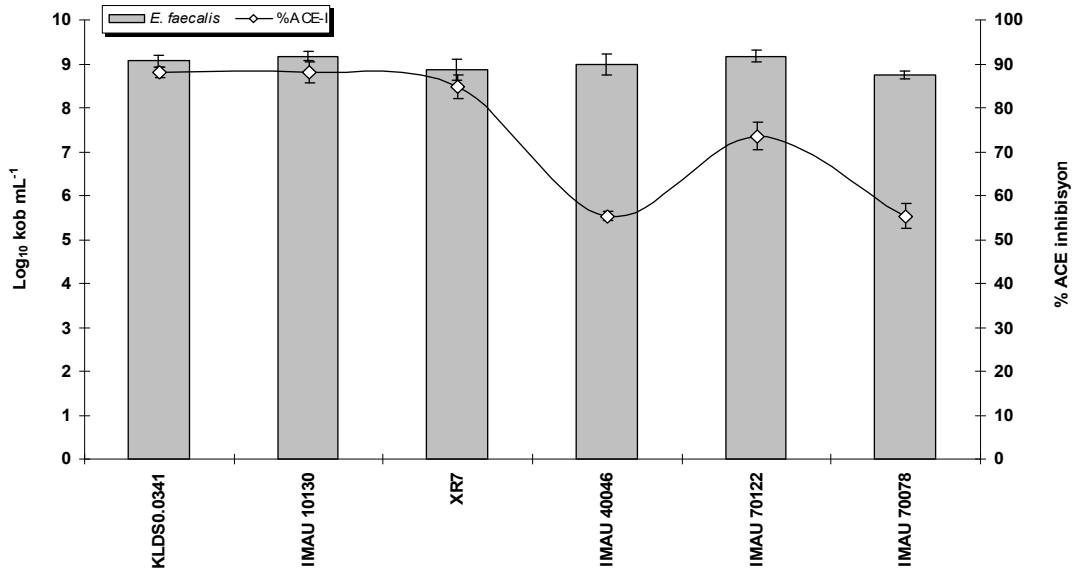
düzeylerinin geniş sınırlar içerisinde değişim gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.17). *Ent. faecalis* ile inoküle edilen fermente süt örneklerinde ise bakteri sayısı ile ACE inhibitör peptid düzeyleri arasında daha yakın bir ilişki tespit edilmiştir. Depolamanın 1. gününde *Ent. faecalis* koloni sayıları $8.74-9.52 \log_{10} \text{ kob mL}^{-1}$ arasında değişirken aynı örneklerin ACE inhibitör peptid konsantrasyonlarının %55.29 ile %88.10 arasında yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.18).

30 günlük depolama süresinin sonunda ise *Ent. faecium* Cg05, L3, IDCC 2104, CS135MX, IMAU 10052, SH 632, IMAU 60169, R8 ve HN-N26 suşları ile inoküle edilen örneklerde ACE inhibitör peptid konsantrasyonunun %7.15 ile %32.43 arasında artış gösterdiği belirlenirken, geri kalan suşlarda ise %2.95-%19.16 arasında azalma kaydedilmiştir. En belirgin artış *Ent. faecium* Cg05, L3 , SH 632 ve R8 suşlarında gözlenirken (sırasıyla %32.06, %30.02, %31.60 ve %32.43) en keskin azalmalar *Ent. faecium* HN-F23 (%19.16) ve Hwo5 (%14.11) suşlarında kaydedilmiştir (Şekil 4.19).

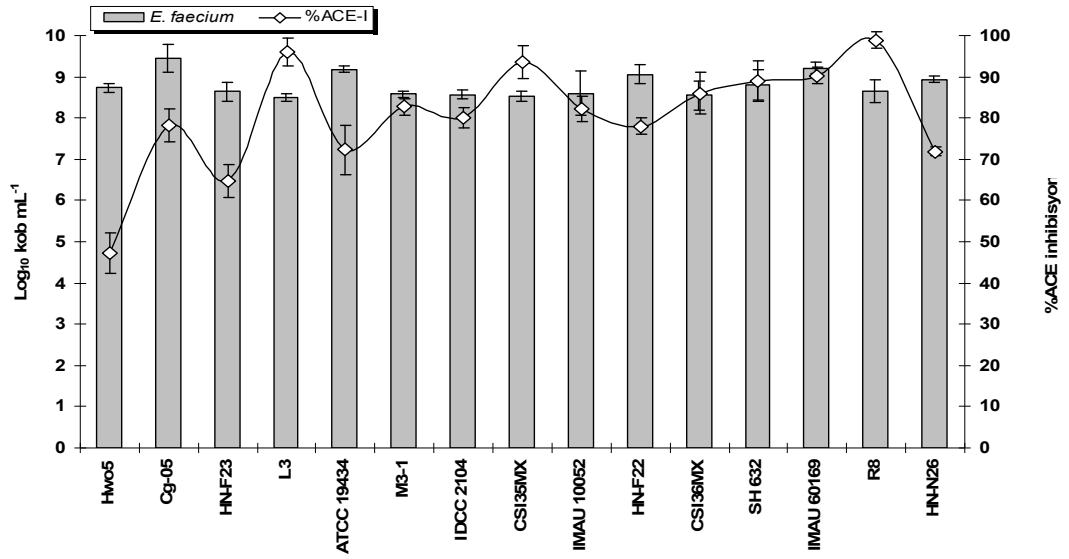
Ent. faecalis suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde ACE inhibisyon oranları %51.18 ile %84.10 arasında değişmiştir. *Ent. faecalis*'in dört suşunda ACE inhibisyon oranları depolama sürecinde azalma göstermiş ve bu azalma %1.80 (IMAU 40046) ile %36.92 (KLDSO.0341) arasında yer almıştır. *Ent. faecalis* IMAU 70078 ve IMAU 70122 ile inoküle edilen fermente sütlerde depolama süresi sonunda ACE inhibisyon düzeyleri peptid seviyesi sırasıyla %28.73 ve %1.00 artış göstermiştir.



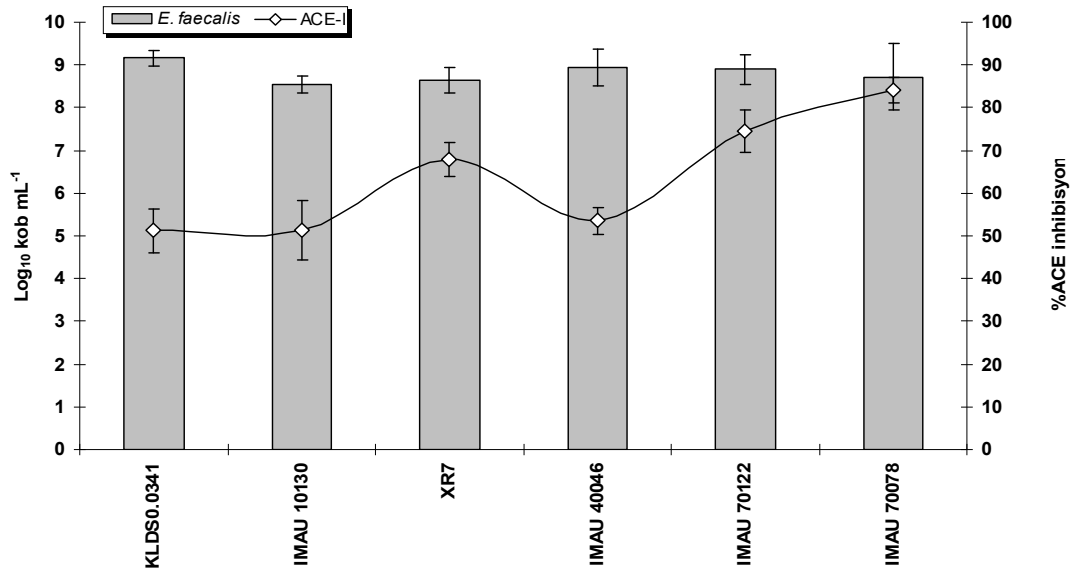
Şekil 4.17. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 1. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki (n=2).



Şekil 4.18. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 1. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki (n=2).



Şekil 4.19. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 30. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki (n=2).



Şekil 4.20. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin depolamanın 30. gününde %ACE inhibisyon değerleri ile koloni sayısı arasındaki ilişki (n=2).

Ent. faecium ve *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1.'de sunulmaktadır. *Ent. faecium* suşları arasında en düşük IC₅₀ değerlerine HN-F23, L3, M3-1, IDCC 2104, CS135MX, HN-F22, R8 ve HN-N26 suşları ile inoküle edilen örneklerin sahip olduğu saptanmıştır. *Ent. faecium*'un değişik suşları ile inoküle edilen fermente sütlerin IC₅₀ değerleri 6.93-49.87 µM arasında değişmiştir. Hwo5, Cg05, IMAU 10052 ve SH 632 suşları ile inoküle edilen örneklerde IC₅₀ değerleri diğer suşlar ile inoküle edilen sütlere oranla daha düşük bulunmuştur (6.93-10.78 µM). *Ent. faecalis*'in değişik suşları ile inoküle edilen örneklerde ise IC₅₀ değerleri 10.58-61.84 µM arasında değişmiştir. *Ent. faecalis* XR7 ve IMAU 70078 suşları ile inoküle edilen UHT sütler nispeten daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olmuştur (sırasıyla 10.58 ve 11.63 µM). ACE inhibisyon yeteneğine sahip peptidlerin IC₅₀ değerleri peptid üretim kaynağı, mikroorganizma, ortam koşulları vb. birçok faktörün etkisi altında oluşmakta ve çok geniş aralıklarda değişmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen IC₅₀ değerleri değerlendirildiğinde Captopril gibi yüksek tansiyon tedavisinde yaygın kullanılan ilaçlar ile karşılaştırıldığında çok düşük olduğu görülmektedir (Captopril'in IC₅₀ değeri 0.007 µmol L⁻¹) (Butikofer ve ark. (2007)).

Çizelge 4.1. *Ent.faecium* ve *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente süt örneklerinin IC₅₀ değerleri (µM±standard hata) (n=2)

<i>Ent. faecalis</i>		<i>Ent. faecium</i>	
Suşlar	IC ₅₀ değerleri	Suşlar	IC ₅₀ değerleri
Hwo5	8.10±0,19	KLDS0.0341	30.01±3.24
Cg05	6.93±0,44	IMAU 10130	37.56±2.15
HN-F23	49.87±0,28	XR7	10.58±0.95
L3	42.71±3.70	IMAU 40046	61.84±4.11
M3-1	36.66±2.11	IMAU 70122	33.75±2.61
IDCC 2104	40.49±1.41	IMAU 70078	11.63±0.81
CS135MX	34.72±3.22		
IMAU 10052	10.23±1.08		
HN-F22	31.67±2.04		
CS136MX	29.91±3.11		
SH 632	10.78±0.88		
IMAU 60169	21.81±2.10		
R8	32.59±3.01		
HN-N26	30.45±1.10		

* **Not:** Düşük IC₅₀ değerleri yüksek ACE inhibisyon kapasitesini işaret etmektedir.

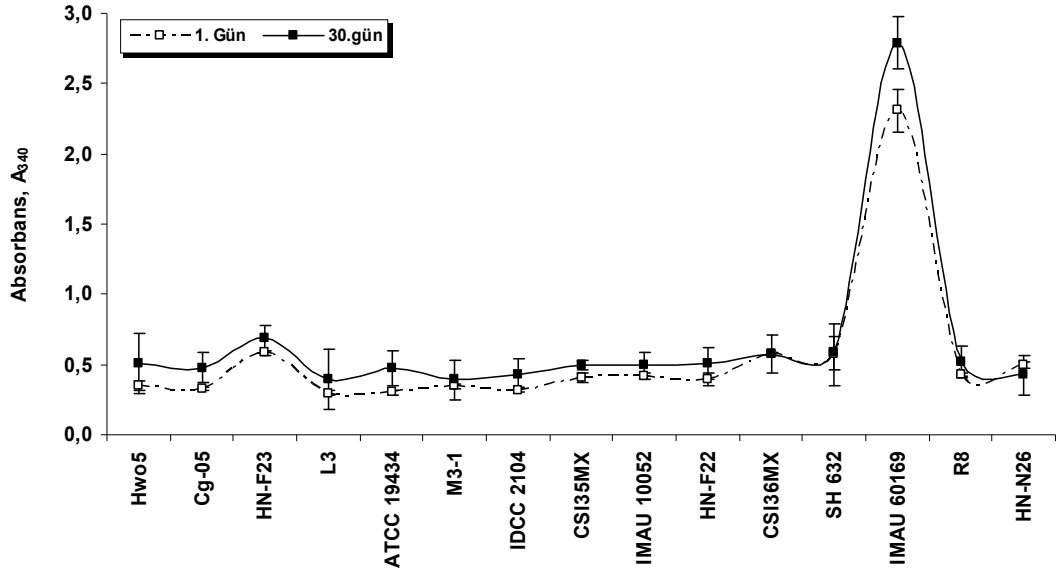
4.6. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* Suşlarının Proteolitik

Özellikleri

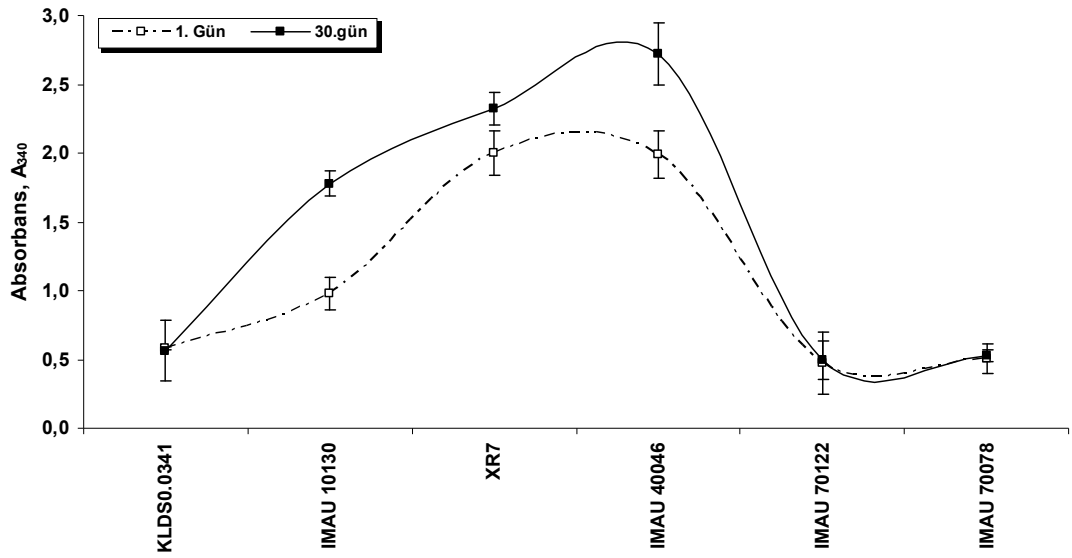
Bakteri suşlarının proteolitik aktiviteleri OPA (*o*-phthaldialdeyde) metodu uyarınca serbest NH₃ grupları konsantrasyonunun ölçümü ile belirlenmiştir. Deneme örneklerinin 1. ve 30. gününe ait proteoliz değerleri Şekil 4.21 ve 4.22’de sunulmaktadır. Buna göre, *Ent. faecium* ile inoküle edilen tüm örneklerde A₃₄₀

absorbans değerleri depolamanın ilerlemesiyle birlikte artış göstermiştir. *Ent. faecium* IMAU 60169 dışında kalan örneklerde A_{340} absorbans değerleri 0.297-0.586 aralığında değişirken IMAU 60169 suşunu içeren örnekte bu değer 2.308 olarak gerçekleşmiştir. Deneysel hata olasılığına karşı analiz 3 kez tekrar edildiğinde de benzer sonuçların elde edildiği görölmüştür. Depolamanın 30. gününde tüm örneklerde A_{340} absorbans değerleri %2 ile %58 arasında artış göstermiştir. En belirgin artış *Ent. faecium* ATCC 19434, en sınırlı artış ise *Ent. faecium* CSI36MX, R8, HN-N26, M3 ve SH 632 suşlarını içeren örneklerde gerçekleşmiştir (Şekil 4.21).

Ent. faecalis suşlarının OPA değerleri arasında büyük farklar olduğu belirlenmiştir. Depolamanın 1. günü A_{340} absorbans değerleri 0.472 ile 1.998 arasında değişim gösterirken, 30. günde %4.1 ile %81 arasında değişen artış oranları ile 0.493-2.720 değerleri arasında yer almıştır. *Ent. faecalis* suşları arasında en belirgin artış %81’lik proteoliz oranı ile IMAU 10130 ve %45’lik proteoliz artışı ile KLDS0.0341 suşlarını içeren ürünlerde gerçekleşirken en yüksek A_{340} absorbans değerine sahip örnekler IMAU 10130 (1.777), XR7 (2.322) ve IMAU 40046 (2.720) suşları ile inoküle edilen sütler olmuştur.



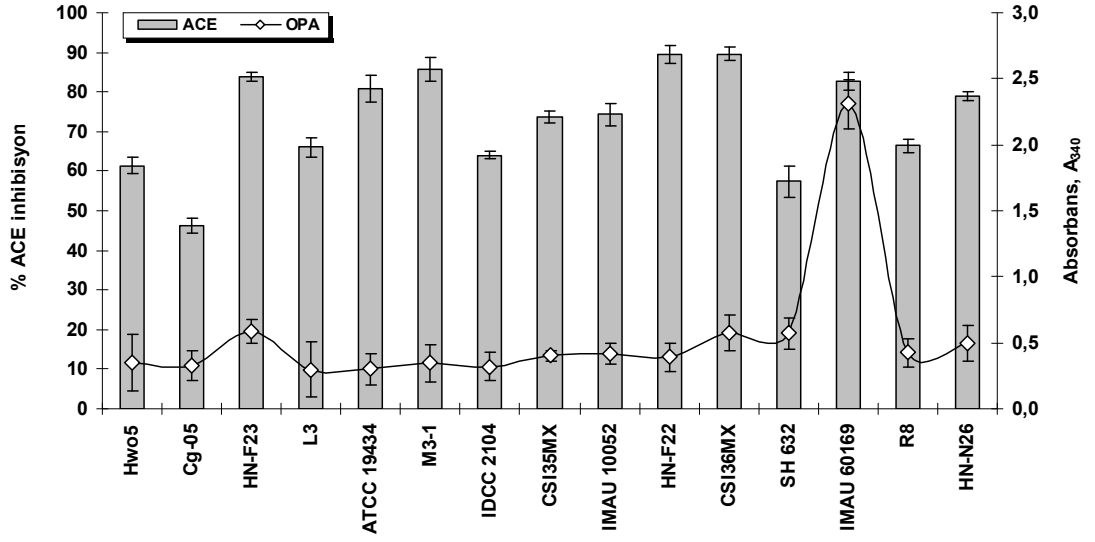
Şekil 4.21. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde OPA proteoliz değerlerinde 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).



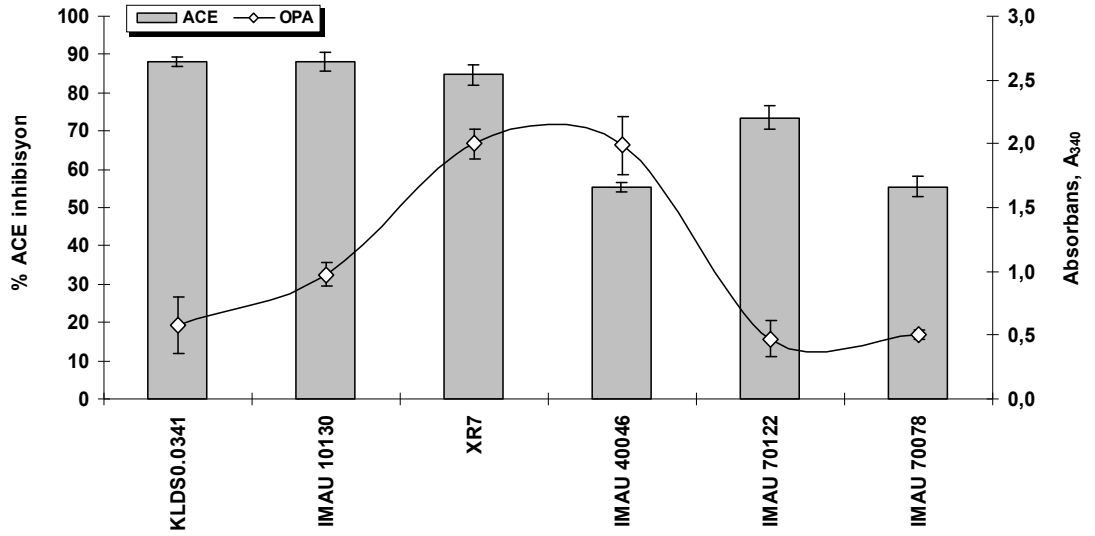
Şekil 4.22. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde OPA proteoliz değerlerinde 30 günlük depolama sürecinde meydana gelen değişimler (n=2).

Deneme örneklerinin depolamanın başlangıcında ACE inhibitör peptid konsantrasyonları ile proteoliz düzeyleri arasındaki ilişki Şekil 4.23 ve 4.24’de sunulmaktadır. Buna göre, *Ent. faecium* suşları içerisinde IMAU 60169 suşu dışında ACE inhibitör peptid ve proteoliz düzeyleri arasında yakın bir ilişkinin varlığı görülmektedir. *Ent. faecium* IMAU 60169 ile fermente edilen örnekte yüksek OPA proteoliz değerine karşılık diğer örneklerden farklı olmayan ACE inhibitör peptid konsantrasyonu değerleri her proteoliz ürününün ACE inhibitör peptid oluşturma zorunluluğu olmadığı görüşünü desteklemektedir. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilerek üretilen fermente sütlerde ise ACE inhibitör peptid ve OPA değerleri arasında bir korelasyon saptanamamıştır (Şekil 4.23). Örneğin, en yüksek ACE inhibitör peptid konsantrasyonuna sahip *Ent. faecalis* KLDS0.0341 en düşük A_{340} absorbans değerine sahip olmuştur. Buna karşın, *Ent. faecalis* IMAU 10130, XR7 ve KLDS0.0341 suşları ile üretilen örneklerde %ACE inhibitör peptid değerleri benzer olmasına karşın A_{340} absorbans değerleri sırasıyla 0.977, 1.998 ve 0.582 olarak tespit edilmiştir. Buna karşın; düşük ACE inhibisyon oranına sahip IMAU 40046 suşunun A_{340} absorbans değeri 1.987 olarak tespit edilmiştir. 30 günlük depolama süreci boyunca OPA ve % ACE inhibisyon değerleri ilişkisindeki değişimler Şekil 4.25-4.26’de sunulmaktadır. Depolamanın 1. gününde saptanan eğilim 30. gün sonunda da benzerliğini korumuştur.

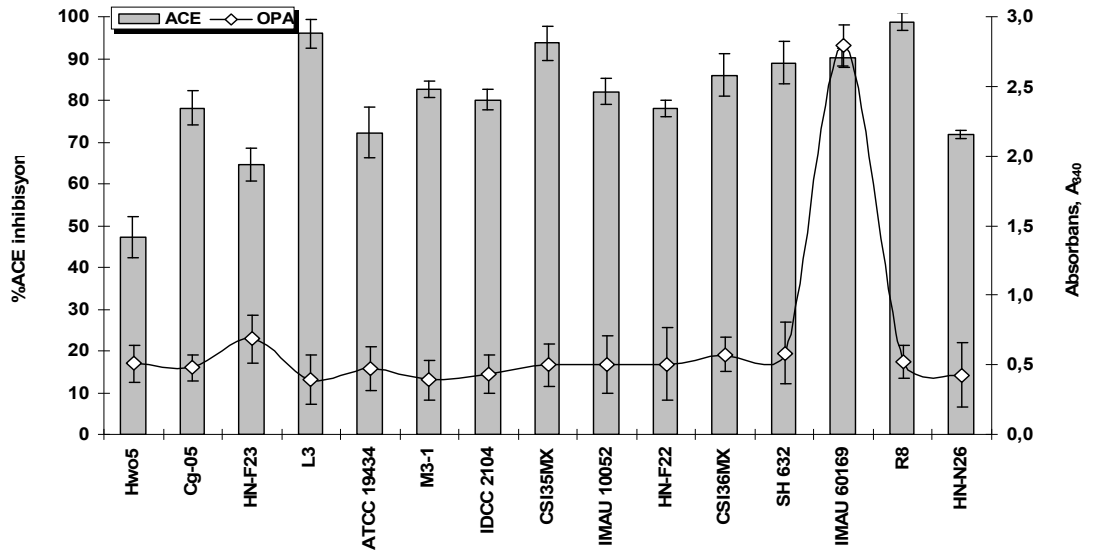
Genel olarak; *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium*’un birçok suşu çok güçlü olmayan proteolitik aktiviteye sahiptir. Sarantinopoulos ve ark. (2001) teknolojik performansları bakımından analiz ettikleri 129 enterokok suşunun 55’inin



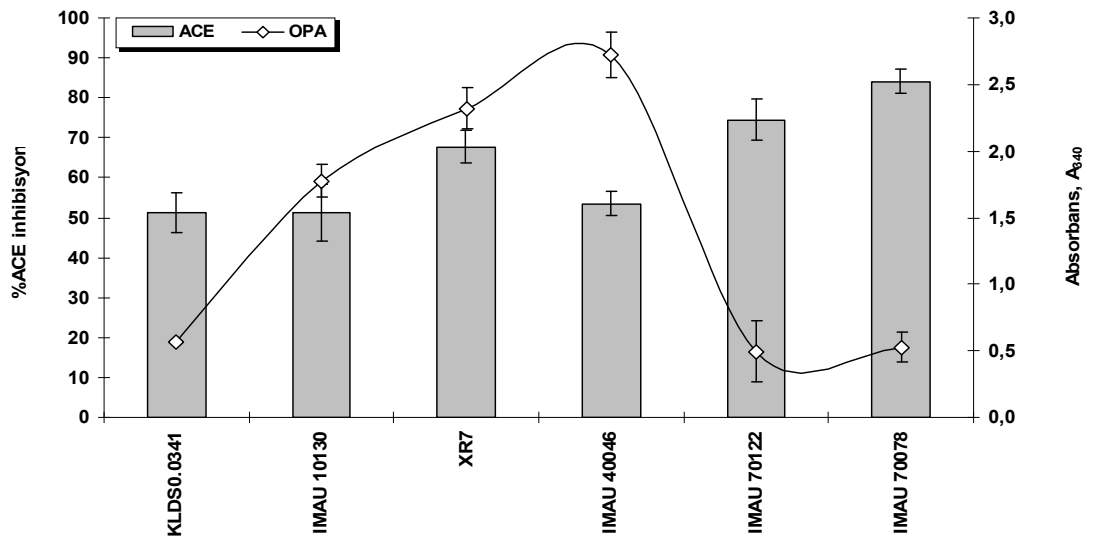
Şekil 4.23. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 1. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki (n=2).



Şekil 4.24. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 1. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki (n=2).



Şekil 4.25. *Ent. faecium* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 30. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki (n=2).

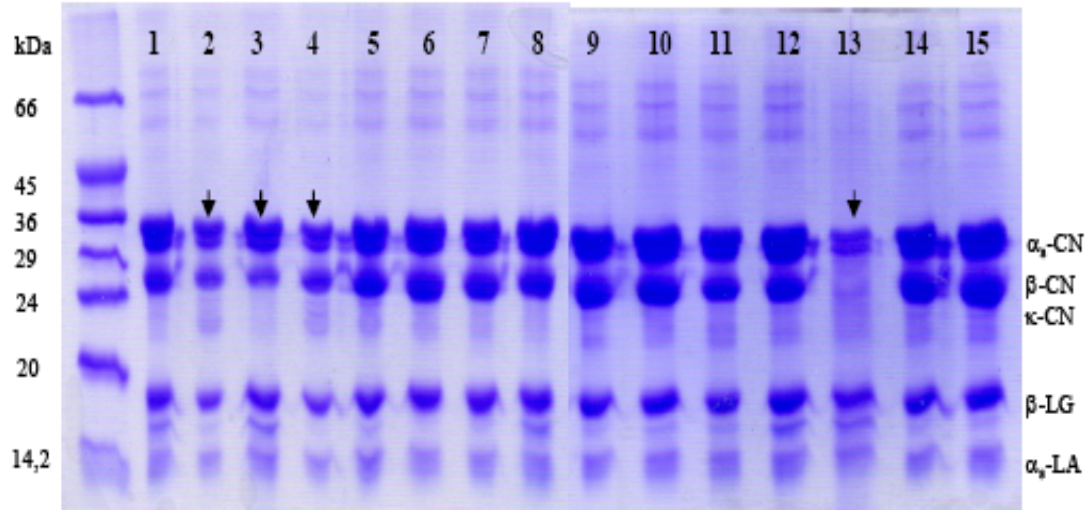


Şekil 4.26. *Ent. faecalis* suşları ile inoküle edilen fermente sütlerde depolamanın 30. gününde proteoliz ve ACE inhibisyon düzeyleri arasındaki ilişki (n=2).

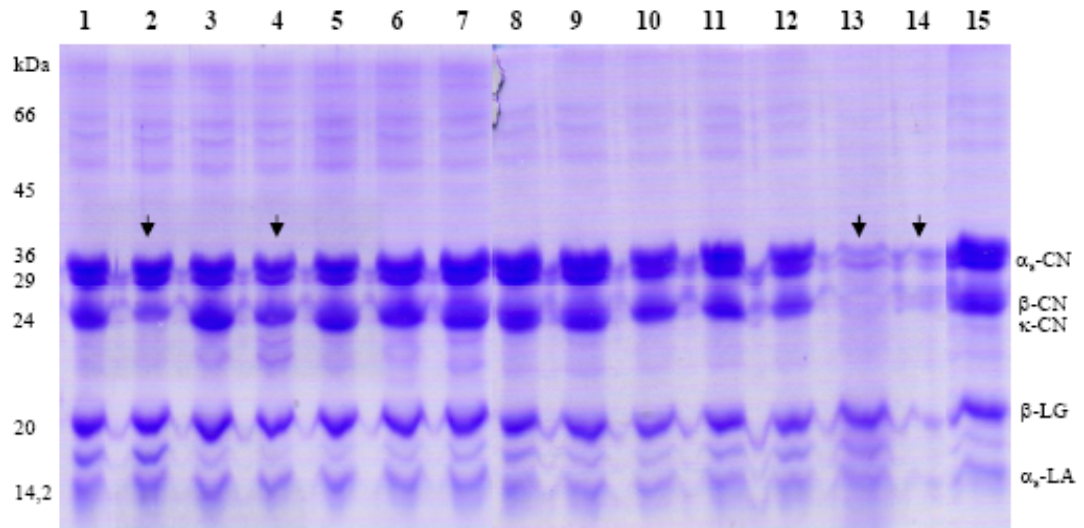
proteolitik aktiviteye sahip olmadığını, 52 suşun ise çok düşük (0.01-2 mM lösin) proteolitik yeteneğinin bulunduğunu saptamıştır. İnsan kaynaklı enterokok suşları zayıf proteolitik kapasiteye sahipken, gıda (süt ürünleri) kökenli enterokokların nispeten daha proteolitik olduğu belirlenmiştir (Sarantinopoulos ve ark., 2001).

Enterokok suşlarının peptidaz aktiviteleri ile ilgili çalışma sayısı fazla olmamakla birlikte genelde düşük peptidaz aktivitesi varlığına vurgu yapılmaktadır (Sarantinopoulos ve ark., 2001; Tsakalidou ve ark., 1994; Arizcun ve ark., 1997; Macedo ve Malcata, 1997). Bu çalışma kapsamında, *Enterococcus* spp.'lerin proteolitik aktiviteleri ile ACE inhibitör peptid düzeyleri arasında bir korelasyonun varlığı tespit edilmemekle birlikte, Regazzo ve ark. (2010) *Ent. faecalis*'in dört farklı suşunun ACE inhibisyon yetenekleri ile proteoliz düzeyleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu ileri sürmektedir. Bu noktada, bakteriyel faaliyet sonucu toplam peptid oluşumunun esas alınması yerine ACE inhibisyon özelliği üst düzeyde olan düşük molekül ağırlıklı peptid ($M_{wt} \leq 3000$ Da) varlığının dikkate alınması daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Fermente süt örneklerinin SDS-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.27- 4.29'da sunulmaktadır. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi depolamanın başlangıcında *Ent. faecium* IMAU 60169 ile fermente edilen süt örneğinde (hat 13) α_s - ve β -kazeini temsil eden bantların yoğunluğunda belirgin azalma olduğu, özellikle β -kazein fraksiyonunun hemen hemen tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bu örnek dışında, *Ent. faecium* Cg05, HN-F23 ve L3 suşları ile fermente edilen örneklerde de β -kazein degradasyonunun belirgin olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde;

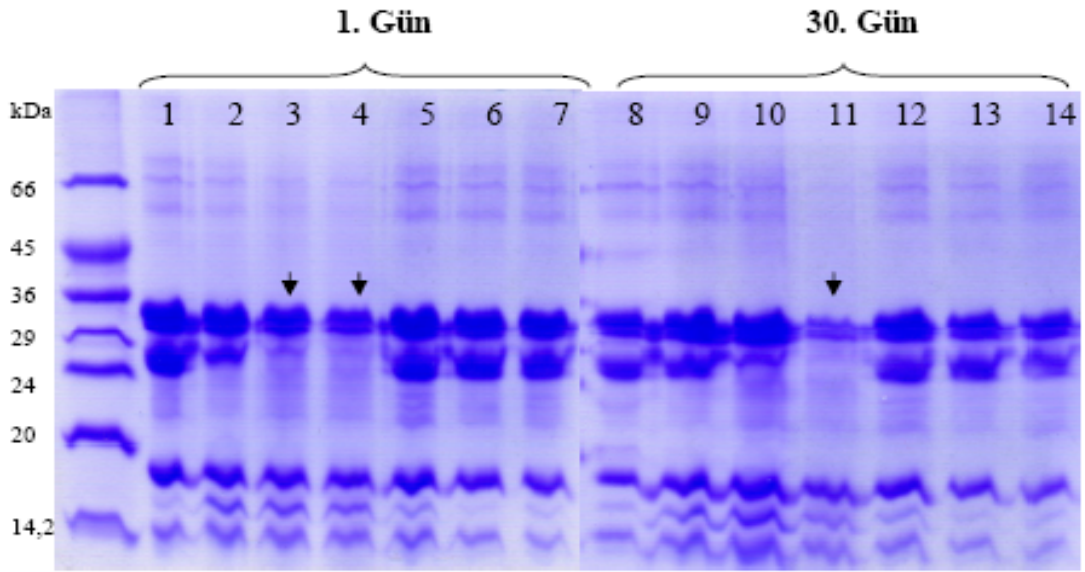


Şekil 4.27. *Enterococcus faecium* suşlarının depolamanın 1. gününe ait elektroforetogramları.



Şekil 4.28. *Enterococcus faecium* suşlarının depolamanın 30. gününe ait elektroforetogramları.

Hatlar: 1-Hwo5, 2-Cg05, 3-HN-F23, 4-L3, 5-ATCC 19434, 6-M3-1, 7-IDCC 2104, 8-CSI35MX, 9-IMAU 10052, 10-HN-F22, 11-CSI36MX, 12-SH 632, 13-IMAU 60169, 14-R8, 15-HF-N26



Şekil 4.29. *Enterococcus faecalis* suşlarının depolamanın 1. ve 30. gününe ait elektroforetogramları.

Hatlar: 1-8 KLDS0.0341, 2-9 IMAU 10130, 3-10 XR7, 4-11 IMAU 40046, 5-12 IMAU 70122, 6-13 IMAU 70122, 7-14 IMAU 70078

Ent. faecalis XR7 ve IMAU 40046 suşları ile inkübe edilen örneklerde de depolamanın başlangıcında β -kazein degradasyonu belirgin şekilde gözlenmiş (Şekil 4.29) ve bu iki örneğe ait OPA değerleri de diğer *Ent. faecalis* suşlarından çok daha yüksek bulunmuştur (A_{340} değerleri sırasıyla depolamanın 1. gününde 1.998 ve 1.987, depolamanın 30. gününde ise 2.322 ve 2.770). Bu iki *Ent. faecalis* suşundan XR7'nin nispeten yüksek ACE inhibisyon oranına sahip olduğu da belirlenmiştir (depolamanın 1. gününde %84.76). Depolama sürecinde tüm örneklerde OPA değerleri artış göstermiştir. Bu artışın *Ent. faecalis*'in üç suşunda (IMAU 10130, XR7 ve IMAU 40046) daha belirgin olduğu saptanmıştır.

Depolama sürecinin sonunda (30. gün) *Ent. faecium* R8 suşu ile inoküle edilen sütlerde de α_s -, β - ve κ -kazein ile β -laktoglobulin'i temsil eden bantlarda belirgin azalma görülmüştür (Şekil 4.28). Ancak, bu örnekte ACE inhibisyon oranı depolamanın başlangıcına oranla yaklaşık %48'lik bir artış göstermiştir. Bu durum ACE inhibisyon özelliğine sahip peptidlerin proteolizin ilerlemesi ile birlikte daha belirgin hale geldiğini göstermektedir.

BÖLÜM V

5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışma kapsamında, geleneksel süt ürünlerinden izole edilen değişik *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının UHT sütte ACE inhibisyon yeteneklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 21 adet yabancı izolattın (15 *Ent. faecium* ve 6 *Ent. faecalis* izolatu) proteolitik özellikleri ve koloni sayıları ile % ACE inhibisyon yetenekleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Ayrıca, 30 günlük depolama sonucunda %ACE inhibisyon değerleri değişimi de değerlendirmeye alınmıştır.

Genel olarak bakteri izolatlarının UHT sütte üreme ve sayısal bütünlüklerini koruma konusunda sorun saptanmamıştır. Gerek 48 saatlik hidrolizasyon gerekse 4 °C’de 30 günlük depolama sürecinde tüm suşların $>10^8$ kob mL⁻¹ düzeyinde olduğu belirlenmiştir. %ACE inhibisyon oranları açısından değerlendirme yapıldığında depolamanın başlangıcında 6 *Ent. faecium* ve 2 *Ent. faecalis* suşunun >80 ACE inhibisyon oranına sahip olduğu belirlenirken, yalnızca bir suşun %ACE inhibisyon oranının %50’nin altında kaldığı görülmüştür. Yüksek ACE inhibisyon yeteneğine sahip suşların sayıca fazlalığı bu suşların ticari üretimlerde kullanım potansiyellerinin yüksekliği sonucunu da doğurmaktadır. Denemede kullanılan izolatlar genotipik ve fenotipik karakterizasyonları daha önce tanımlanan suşları

içerdiğinden tekno-fonksiyonel özellikleri hakkında detaylı bilgiler mevcuttur. Toksikolojik testlerinin tamamlanmalarının ardından uygun suşların özellikle fermente süt ürünlerinde kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bakteri suşlarının ACE inhibisyon peptid üretme yetenekleri hem suşa hem de zaman bağımlılık göstermektedir. Depolama süresi boyunca *Ent. faecium*'a ait altı suşun ACE inhibisyon yeteneği %2.95-%19.16 arasında azalırken, dokuz suşun inhibisyon oranları %7.15-32.43 aralığında artmıştır. *Ent. faecalis* için bu değerler aynı sıra ile %1-%28.73 (dört suş) ve %1.80-%36.92 (iki suş) olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca, deneme örneklerinin proteolitik yetenekleri ile %ACE inhibisyon kapasitesine sahip peptid üretme yetenekleri arasında direkt bir ilişki kurulamamıştır. Bir anlamda, yüksek proteolitik suşların %ACE inhibitör peptid üretme becerileri yüksek bulunmamıştır. Bu bulgu, ACE inhibisyon etkisine sahip peptidlerin suşa spesifik olduğu ve suşların peptid zincirini parçalama noktalarının ACE inhibisyon kapasitesinin oluşumunda toplam proteolizden daha önemli bir kriter olduğu bilgisi ile paralellik göstermektedir. Yüksek OPA değerine sahip olan suşlara ait suda çözünen azot elektroforetogramlarında özellikle β -kazein ve α -kazeinde belirgin parçalanmalar meydana geldiği görülmesine karşın; bu suşlarda ACE inhibisyon oranları sınırlı kalmıştır.

Sonuç olarak; elde edilen bulgular ışığında yüksek %ACE inhibisyon kapasitesine sahip olan ve bu kapasitelerini depolama süresi boyunca koruyabilme özelliği gösteren *Ent. faecium* HN-F23, ATCC 1943, M3-1, HN-F22, CSI36MX, HN-N26, IMAU 60169 suşları ile *Ent. faecalis* IMAU 70122 ve IMAU 70078 suşlarının toksiko-lojik karakterizasyonlarının yapılması, probiyotik özellik taşıyıp taşımadıklarının test edilmesi ve ACE inhibisyon özelliğine sahip peptidlerin

izolasyon ve tanılamalarının yapılmasının gerekli olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda olumlu özellikler taşıyan suşların anti-hipertansif nitelikli fermente süt bazlı içeceklerin üretiminde kullanımı söz konusu olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12): 3131-3138.
- Ackley, S., Barrett-Connor, E. and Suarez, L. 1983. Dairy products, calcium, and blood pressure. *American Journal of Clinical Nutrition*, 38: 4457-461
- Anonim. 1981. Çiğ süt standardı. TS 1018. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
- Arana, I., Medina, C., Arizcun, C., Barcina, Y. and Torre, P. 2003. Technical attribute-based selection of *Enterococcus* strains for addition to a starter culture for making an ewe's-milk cheese. *Milchwissenschaft*, 58(11-12): 627-630.
- Ariyoshi, A. 1993. Angiotensin converting enzyme-inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 139-144.
- Arizcun, C., Barina, Y. and Torre, P. 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idizabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 17-24.
- Ashar, M.N. and Chand, R. 2004. Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, 59: 363-366.
- Bellomo, G., Mangiagale, A., Nicastro, L. and Frigerio, G. 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research*, 28: 927-936.
- Birello, G.A., Reinheimer, J.A. and Vinderola, C.G. 2001. *Enterococci* vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology*, 18: 597-604.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R. and Wechsler, D. 2007. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17(8): 968-975.

Cappuccio, F.P. and MacGregor, G.A. 1991. Does potassium supplementation lower blood pressure- A meta-analysis of published trials. *Journal of Hypertension*, 9(5): 466-473.

Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. and Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 76: 217-246.

Chobert, J.M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarrrondo, M., Métro, F., Choiset, Y. and Haertlé, T. 2005. Angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of yogurts obtained by using different starters. *Lait*, 85(3): 141-152.

Cushman, D.W. and Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry Pharmaceuticals*, 26: 1637-1638.

Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondetti, M.A. 1977. Design of potent competitive inhibitors of an angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkonyl amino acids. *Biochemistry*, 16: 5484-5491.

Clare, D.A. and Swaisgood, H.E. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.

Delgado, S., Delgado, T. and Mayo, B. 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *Journal of Food Protection*, 65(10): 1590-1596.

Dickinson, H.O., Nicolson, D.J., Campbell, F., Cook, J.V., Beyer, F.R., Ford, G.A. and Mason, J. 2006. Magnesium supplementation for the management of primary hypertension in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 19(3), CD004640.

Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasilijevic, T. and Shah, N.P. 2007. ACE inhibitory activity of probiotic yogurt. *International Dairy Journal*, 17: 1321-1331.

Eaton, T.J. and Gasson, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1628-1635.

FitzGerald, R.J. and Meisel, H. 1999. Lactokinins: Whey protein derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung*, 43(3): 165-167.

FitzGerald, R.J., Murray, B.A. and Walsh, D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134: 301-310.

Flint, S. 2002. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. In: Huginski, R. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Elsevier Applied Sciences, pp. 904-907.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 1-24.

Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Holzapfel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9): 4385-4389.

Freitas, A.C., Pintado, A.E, Pintado, M. E. and Malcata, F. X. 1999. Organic acid produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. *European Food Research and Technology*, 209: 434-438.

Fuglsang, A., Nilsson, D. and Nyborgi N.C.B. 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3566-3569.

Fuglsang, A. Rattray, F.P., Nilsson, D. and Nyborgi N.C.B. 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Antonie Leeuwenhoek*, 83: 27-34.

Garcia-Palmieri, M., Costas, R., Cruz-Vidal, M., Sorlie, P., Tillotson, J. and Havlik, R. 1984. Milk consumption, calcium intake and decreased hypertension in Puerto Rico: Puerto Rico Heart Health Program Study. *Hypertension*, 6: 322-328.

Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C., 1999a. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 4907-4916.

Gardiner, G.E., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P., 1999b. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 82: 1379-1387.

Geerlings, A., Villar, I.C., Hidalgo-Zarco, F. Sanchez, M., Vera, R., Zarfa-Gomez, A., Boza, J. and Duarte, J. 2006. Identification and characterization of novel angiotensin-converting enzyme inhibitors obtained from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 3326-3335.

Gibson, G. 2002. Probiotics: a growth industry. *Dairy Industries International*, January: 18-20.

Giraffa, G., Carminati, D. and Neviani, E. 1997. Enterococci isolated dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 6: 732-738.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffreid, F. and Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3898-3904.

Gobbetti, M., Stepniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. and Di Cagno, R. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 42: 223-239.

Gobbetti, M., Minervini F. and Rizzello C.G. 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 2-3.

Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M. and Recio, I. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12: 697-706.

Griffith, L.E., Guyatt, G.H., Cook, R.J., Bucher, H.C. and Cook, D.J. 1999. The influence of dietary and nondietary calcium supplementation on blood pressure- An updated metaanalysis of randomized controlled trials. *American Journal of Hypertension*, 12(1), 84-92.

GuangWen, C., JennShou, T. and Suin, P. 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17(6): 641-647.

Guo, Y., Pan, D. and Tanokura, M. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 114: 328-333.

Guslandi, M. 2003. Probiotics for chronic intestinal disorders. *American Journal of Gastroenterology*, 98(3): 520-521.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajim, K., Nakamura, Y. and Takano, T. 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5):761-767.

Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1504-1510.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.

Hugas, M., Garria, M. and Aymerich, M.T. 2003. Functionality of *Enterococci* in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3): 223-233.

Ijäs, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M.L. 2004. Antihypertensive opioid-like milk peptide alpha-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice. *International Dairy Journal*, 14(3): 201-205.

Kırmacı, H.A. 2010. Geleneksel Urfa peynirinde yer alan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve starter kültür olarak kullanım olanakları. Doktora Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, pp. 152.

Kilara, A. and Panyam, D. 2003. Peptide from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6): 607-633.

Kim, Y.E., Yoon, S., Yu, D.Y., Lönnerdal, B. and Chung, B.H. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{s1} -casein expressed in *Eschericia coli*. *Journal of Dairy Research*, 66: 431-439.

Kitts, D.D. and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16): 1309-1323.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2): 103-125.

Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2003. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2): 129-134.

Korhonen, H. and ve Pihlanto-Leppälä, A. 2004. Milk-derived bioactive peptides: formation and prospects for health promotion. In Shortt, C and O'Brein, J. (eds.), *Handbook of functional dairy products. Functional foods and nutraceuticals series 6.0*, CRC Press, Florida, pp. 109-124.

Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9): 945-960.

Kusump, S. 2006. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides released from the hydrolysate of casein and the milk fermented by *Lactobacillus casei* ADA03. M.Sc. Thesis, Univeristy of Alberta, 201 p.

Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. and Oki, T. 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Journal of Japanese Society of Food Science*, 48: 44-50.

Leclerc, P.L., Gauthier, S.F., Bachelard, H., Santure, M. and Roy, D. 2002. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 12: 995-1004.

Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H. and Shrestha, S. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmaceutical effects. *Nutrition Research*, 24: 469-486.

- Lund, B., Adamson, I. and Edlund, C. 2002. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 109-115.
- Macedo, C.A. and Malcata, F.X. 1997. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese. Preliminary screening. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205: 25-30.
- Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T. 1996. Isolation of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79: 1316-1321.
- Maes, W., van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelsgrs, J.M., Schrezenmeier, J., van Oostveldt, P. and Huyghebaert, A. 2004. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118: 105-109.
- Manso, M.A. and Lopez-Fandino, R. 2003. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of bovine, ovine and caprine kappa-casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 66(9): 1686-1692.
- Maruyama, S. and Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin-I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 464(5): 1393-1394.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. 1985. Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. 2. isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(5): 1405-1409.
- Masuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T. 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*, 126: 3063-3068.
- Matar, C., LeBlanc, J.G., Martin, L. and Perdigon, G. 2003. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions In Farnworth, E.R. (ed.), *Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceutical series*, CRC Press, Florida, pp. 177-201.
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzed derived from sardine muscle. *Bioscience, Biochemistry and Biotechnology*, 57: 922-925
- Meisel, H. and Schlimme, E. 1994. Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). In: Brantl, V. and Teschemacher, H. (eds), β -casomorphins and related peptides: Recent developments, New York, VCH, pp 27-33.

Meisel, H., Goepfert, A. and Gunther, S. 1997. ACE-inhibitory activities in milk proteins. *Milchwissenschaft*, 52: 307-311.

Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8(5-6):363-373.

Meisel, H. and FitzGerald, R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16): 1289-1295.

Miguel, M., Muguerza, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M. and Aleixandre, M. A. 2005. Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Brazilian Journal of Nutrition*, 94: 36-43.

Miguel, M., Contreras, M.M., Recio, I. and Aleixandre, A. 2009. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 112(1): 211-214.

Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, F. and Gobetti, M. 2003. Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory and anti-bacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5297-5305.

Miyoshi, S., Kaneko, T., Yoshizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 1407-1408.

Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T. and Nakamura, Y. 2004. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertensive*, 17: 701-706.

Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 1-24.

Muguerza, B., Ramos, M., Sanchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A. and Recio, I. 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolates from raw milk. *International Dairy Journal*, 16: 61-69.

Mullally, M.M., Meisel, H. and FitzGerald, H.J. 1997a. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7(5): 299-303.

Mullally, M.M., Meisel, H. and Fitzgerald, R.J. 1997b. Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402: 99-101.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okuba, A., Vamazak, S. and Takano, T. 1995a. Purification and characterisation of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4): 777-783.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. and Takano, T. 1995b. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78(6): 1253-1257.

Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I. and Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH and storage time. *International Dairy Journal*, 19(3): 155-165.

Nurminen, M.L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, R. and Vapaatalo, H. 2000. Alpha-lactorphan lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66(16): 1535-1543.

Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Kouzimu, Y. and Yanagida, F. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59: 1147-1149.

Ortiz-Chao, P., Gomez-Ruiz, J.A., Rastall, R.A., Mills, D., Crame, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. and Jauregi, P. 2009. Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*, 19: 69-76.

Otte, J., Shalaby, S.M.A., Zakora, M. and Nielssen, M.S. 2007. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17: 1460-1472.

Özer, B.H. 1997. Rheological properties of labneh (concentrated yogurt). Doktora Tezi, The University of Reading.

Özer, B.H. and Kırmaç, H.A. 2010. Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1): 1-15.

Pan, D., Luo, Y. and Park, M. 2005. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chemistry*, 91: 123-129.

Perpetuo, E.A., Juliano, L. and Lebrun, I. 2003. Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides obtained from tryptic hydrolysis of casein. *Journal of Food Chemistry*, 22(7-8): 601-606.

Pihlanto-Leppälä, A., Roka, T. and Korhonen, H. 1998. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8: 325-331.

- Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepniak, L. and Sorhaug, T. 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Tehcnology*, 219(6): 579-583.
- Quiros, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. and Recio, I. 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17: 33-41.
- Regazzo D., Dalt L.D., Lombardi A., Andrighetto C., Negro A. and Gabai G. 2010. Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Science and Technology*, 90: 469-476.
- Richelsen, B., Kristensen, K. and Pedersen, S.B. 1996. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins: a placebo-controlled and double blind study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50: 811-815.
- Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M. and Juillerat, M.A. 2004. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6923-6931.
- Rokka, T., Syvaaja, E.L., Tuominen, J. and Korhonen, H. 1997. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenscahft*, 52(12): 675-677.
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C., 2002. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 71-78.
- Ryhanen, E., Pinhalto-Leppala, A. and Pahkala, E. 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 11: 441-447.
- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F. and Valdez, G.F. 2003. Hommade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Internatioal Journal of Food Microbiology*, 88: 241-245.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83: 1434-1440.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11: 621-647.
- Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S. and Shimizu, M. 2002. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide Val-Pro-Pro in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 378-384.

Sekiya, S., Osajima, K., Matsufuji, H., Matsui, T. ve Osajima, Y. 1992. Val-Tyr, an angiotensin-I converting enzyme-inhibitor from sardines that have resistance to gastrontestinal proteases. Journal of Japanese Society of Bioscience, Biochemistry and Agrosiences, 69: 1013-1020.

Seppo, L., Kerojoki, O., Suolamainen, T. and Korpela, R. 2002. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension- a pilot study on humans. Milchwissenschaft, 57(3): 124-127.

Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. and Korpela, R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects. American Journal of Clinical Nutrition, 77: 326-330.

Sheish, C., Fang, T. J. and Wu, T.K. 2009. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. Food Chemistry, 115: 279-284.

Shim, J.J., Shin, J.H., Lee, S.J., Sim, J.H., Kim, S.K. and Baek, Y.J. 1996. 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Netherlands, Book of Abstracts, J13.

Shuangquan, Tsuda, H. and Miyamoto, T. 2008. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(15): 2688-2692.

Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M.L. 2001. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Journal of Physiology and Pharmacology, 52(4): 745-754.

Sipola, M., Finckenberg, P., Vapaatalo, H., Pihlanto-Leppälä, H., Korhonen, H., Korpela, R. and Nurminen, M.L. 2002. Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. Life Sciences, 71(11): 1245-1253.

Smacchi, E. and Gobbetti, M. 1998. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescence* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. Enzyme Microbiology and Technology, 22: 687-694.

Stanton, C. and Ross, R.P. 2000. New Probiotic Cheddar Cheese. End of Project Report. ISBN: 1 84170 122 X, ARMIS No. 4266, DPRC No. 29. Irish Agriculture and Food Development Authority, Dairy Products Research Centre Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co., Cork, Ireland. (<http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproductio/4266/eopr-4266.pdf>).

Stefanova, T., Urshev, Z., Dimitrov, Z., Fatchikova, N. and Minkova, S. 2009. Species affiliation of dairy lactobacilli with angiotensin converting enzyme inhibitory activity. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 23(2): 1250-1254.

Stepniak, L., Fox, P.F., Sorhaug, T. and Grabska, J.J. 1995. Effect of peptides from the sequence 58-72 of β -casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase and X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 849-853.

Suetsuna, K. and Osajima, K. 1989. Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science, 42: 47-54.

Suzzi, G., Caruso, M., Gadrini, F., Lombardi, A., Vanini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C. and Lonarte, M. T. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology, 89: 2676-274.

Takano, T. 2002. Antihypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 82(1-4): 333-340.

Tauzin, J., Miclo, L. and Gaillard, J.L. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein. FEBS Letters, 531(2): 369-374.

Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M. and Oda, M. 2008. Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. Journal of Dairy Research, 75: 284-290.

Torres-Lianez M.J., Gozalez-Cordova A.F., Hernandez-Mendoza A., Garcia H.S. and Vallejo-Cordoba B. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. Journal of Dairy Science, 94: 3794-3800.

Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabarak, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K. and Kalantzopoulos, G. 1994. The combined use of whole cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. Systematic and Applied Microbiology, 17: 444-458

Vael, C. and Goossens, H. 2002. Enterococci as probiotics: chances and challenges. Presentations: *Enterococci* in foods: functional and safety aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, 30-31 May 2002, Berlin, Germany.

Vermeirssen, V., Camp, J.V. and Verstraete, W. 2002. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 51: 75-87.

Villani, F. and Coppola, S. 1994. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Annales Microbiologia Enzimologia, 44: 97-105.

Wako, Y., Ishikawa, S. and Muramoto, K. 1996. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60(8): 1353-1355.

Walsh, D.J., Bernard, H., Murray, B.A., MacDonald, J., Pentzien, A.K., Wright, G.A., Wal, J.-M., Struthers, A.D., Meisel, H. and FitzGerald, R.J. 2004. *In vitro* generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of Dairy Science*, 87: 3845-3857.

Yamamoto, N. and Takano, T. 1999. Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*, 43(3): 159-164.

Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82: 1388-1393.

Yamamoto, N., Ejiri, M. and Mizuno, S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1345-1355.

Yano, S., Suzuki, K. and Funatsu, G. 1996. Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(4): 661-663.

Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(10): 1541-1545.