

PAPER DETAILS

TITLE: Alternatif protein kaynagi *Spirulina platensis* ile zenginlestirilen kefirin γ -aminobütirik asit (GABA), karnosin, anserin, 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve indirgen seker içeriği

AUTHORS: Murat Emre Terzioğlu, Ezgi Edebali, İhsan Bakırcı

PAGES: 118-130

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/3584037>



Alternatif protein kaynağı *Spirulina platensis* ile zenginleştirilen kefirin γ -aminobütirik asit (GABA), karnosin, anserin, 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve indirgen şeker içeriği

γ -aminobutyric acid (GABA), carnosine, anserine, 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and reducing sugar content of kefir fortified with alternative protein source *Spirulina platensis*

Murat Emre TERZİOĞLU^{1*}, Ezgi EDEBALI², İhsan BAKIRCI³

^{1,2,3} Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 25240, Erzurum, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-6370-0694>; ²<https://orcid.org/0000-0001-6912-7569>; ³<https://orcid.org/0000-0002-3744-3863>

To cite this article:

Terzioğlu, M. E, Edebalı, E. & Bakırcı, İ. (2024). Alternatif protein kaynağı *Spirulina platensis* ile zenginleştirilen kefirin γ -aminobütirik asit (GABA), karnosin, anserin, 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve indirgen şeker içeriği. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(1): 118-130
DOI: 10.29050/harranziraat.1401399

***Address for Correspondence:**
Murat Emre TERZİOĞLU
e-mail:
murat.terzioglu@atauni.edu.tr

Received Date:

06.12.2023

Accepted Date:

16.02.2024

Öz

Hayvansal üretim faaliyetleri esnasında oluşan atıkların, çevre kirliliğine neden olması ve küresel ısınmanın bir nedeni olarak gösterilen sera gazı emisyon oranını arttırması başta *Spirulina platensis* olmak üzere protein açısından zengin mikroalg kaynaklarını gündeme getirmiştir. Daha az enerji kullanılarak, uygun maliyetle sürdürülebilir yetiştirme imkanlarına sahip olan *S. platensis* yüksek protein içeriğinin yanı sıra çevre dostu kimliğiyle dikkatleri üzerine çekmiştir. Mevcut çalışmada içerdiği probiyotik mikroorganizmalar neticesinde fonksiyonel gıda olarak nitelendirilen kefire farklı oranlarda (%0.5, %1 ve %1.5) *S. platensis* ilave edilmiş ve örneklerde nörotransmitter madde olarak nitelendirilen γ -aminobütirik asit (GABA) içeriğinin yanı sıra nörolojik hastalıkların ve dokularda biriken oksidatif stresin önlenmesinde önemli bir rol oynayan karnosin ve anserin dipeptitlerinin içeriği belirlenmiştir. Ayrıca kefir örneklerinde indirgen şeker ve Maillard reaksiyon ürünü olan 5-hidroksimetilfurfural (HMF) oluşumu incelenerek *S. platensis* ilavesinin etkisi ortaya konmuştur. Bu bağlamda, kefir örneklerine *S. platensis* ilavesinin istatistiksel olarak GABA, karnosin ve HMF değerleri üzerinde çok önemli ($p<0.01$) ve indirgen şeker üzerinde önemli ($p<0.05$) etkiye sahip olduğu, anserin üzerinde ise önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Kontrol grubu kefir örneklerinde GABA içeriğinin 544.52 nmol mL⁻¹ olduğu belirlenirken, *S. platensis* ilavesiyle artarak 1310.62-2055.12 nmol mL⁻¹ arasında değiştiği saptanmıştır. Benzer şekilde karnosin ve anserin içeriklerinin de *S. platensis* ilavesiyle artarak, sırasıyla 10.51-16.01 nmol mL⁻¹ ve 12.41-17.38 nmol mL⁻¹ arasında değiştiği belirlenmiştir. Kefir örneklerinde saptanan HMF içeriği *S. platensis* ilavesiyle artmış olmasına rağmen, tüketilebilir limitler içerisinde yer aldığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak, *S. platensis* ilaveli kefir örneklerinin GABA, karnosin ve anserin kaynağı ve fonksiyonel bir ürün olarak tüketimi tavsiye edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, kefir, γ -aminobütirik asit (GABA), karnosin, anserin, 5-hidroksimetilfurfural (HMF)

ABSTRACT

The fact that the wastes generated during animal production activities cause environmental pollution and increase the rate of greenhouse gas emissions, which is shown as a cause of global warming, has brought protein-rich microalgae resources, especially *Spirulina platensis*, to the agenda. *S. platensis*, which has sustainable cultivation opportunities with less energy and affordable cost, has attracted attention with its high protein content as well as its environmentally friendly identity. In the present study, *S. platensis* was added at different ratios (0.5%, 1% and 1.5%) to kefir, which is characterized



as a functional food due to the probiotic microorganisms it contains, and the content of γ -aminobutyric acid (GABA), which is characterized as a neurotransmitter substance, as well as carnosine and anserine dipeptides, which play an important role in the prevention of neurological diseases and oxidative stress accumulated in tissues, were determined in the samples. In addition, the effect of *S. platensis* addition was revealed by analyzing the formation of reducing sugar and Maillard reaction product 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in kefir samples. In this context, it was determined that the addition of *S. platensis* to kefir samples statistically had a very significant effect on GABA, carnosine and HMF values ($p < 0.01$) and a significant effect on reducing sugar ($p < 0.05$), while it had no significant effect on anserine ($p > 0.05$). While the GABA content was $544.52 \text{ nmol mL}^{-1}$ in the control group kefir samples, it increased with the addition of *S. platensis* and ranged between 1310.62 - $2055.12 \text{ nmol mL}^{-1}$. Similarly, carnosine and anserine contents increased with the addition of *S. platensis* and ranged between 10.51 - $16.01 \text{ nmol mL}^{-1}$ and 12.41 - $17.38 \text{ nmol mL}^{-1}$, respectively. Although HMF content in kefir samples increased with the addition of *S. platensis*, it was found to be within the consumable limits. In conclusion, kefir samples with *S. platensis* addition are recommended to be consumed as a source of GABA, carnosine and anserine and as a functional product.

Key Words: *Spirulina platensis*, kefir, γ -aminobutyric acid (GABA), carnosine, anserine, 5-hydroxymethylfurfural (HMF)

Giriş

Kökeni Kuzey Kafkasya'ya dayanan kefir, starter kültür veya dane ilave edilerek sütün fermantasyona uğratılması sonucu elde edilen ve hafif ekşimsi bir tada sahip olan fermente süt ürünüdür (Arslan, 2015; Rosa ve ark., 2017). Bünyesinde barındırdığı mikroorganizmalar sayesinde doğal probiyotik bir süt ürünü olan kefirin, insan sağlığı üzerinde çeşitli nutrasötik ve terapötik etkileri bulunmaktadır (Hutkins, 2006). Kefir günlük diyetle dahil edildiğinde vücutta sindirim sistemini düzenlemekte, bağırsak mikroflorasını olumlu yönde etkilemekte, kanserli hücre oluşumunun önüne geçmekte, kalp-damar hastalıklarını önlemekte ve kan şekerini dengelemektedir (Rosa ve ark., 2017). Diğer taraftan sağlık üzerinde pek çok yararı bulunmasına rağmen, protein kalitesi ve biyolojik değeri bakımından et (protein verimlilik oranı 2.9 g g^{-1}) ve yumurta (protein verimlilik oranı 3.9 g g^{-1}) gibi diğer hayvansal kaynaklı gıdalara kıyasla kefirin (protein verimlilik oranı 0.84 g g^{-1}) nispeten fakir bir gıda olması, bu eksikliği iyileştirmeyi zorunlu kılmaktadır (Urdaneta ve ark., 2007; Pellegrino ve ark., 2013; Aktaş, 2022).

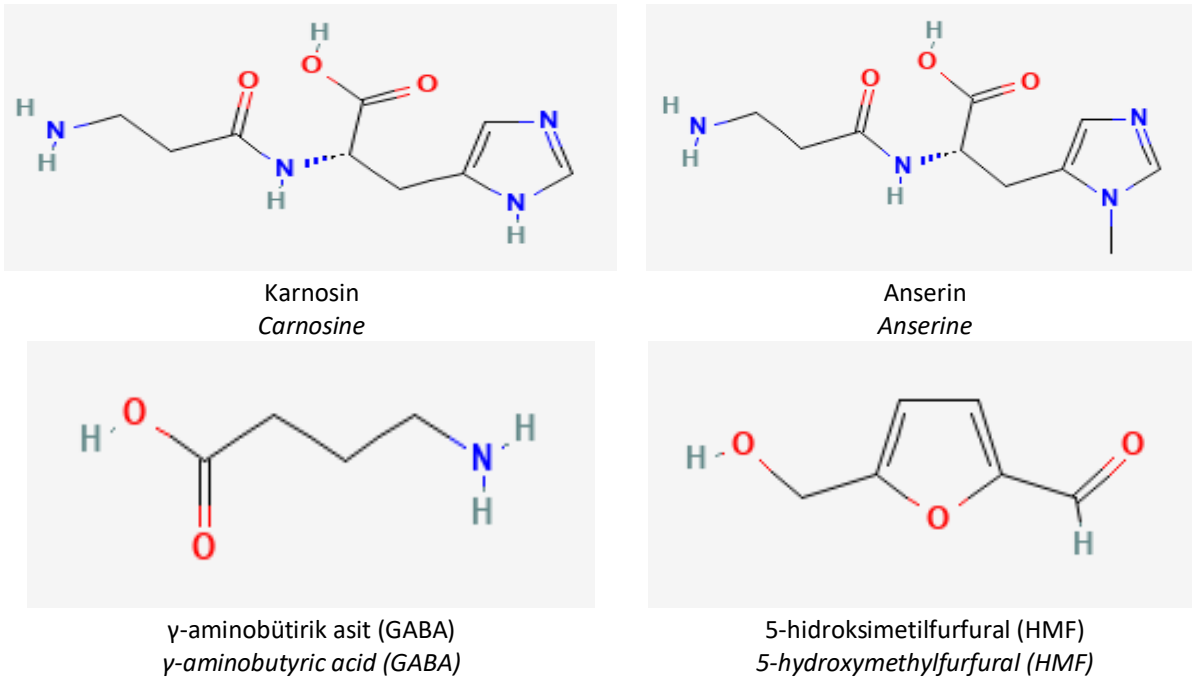
Gıda matrisindeki kompleks makro moleküllerden biri olan proteinler, amino asitlerin peptit bağları ile birbirine bağlanması sonucu oluşan uzun zincirli polimerlerdir (Bilişli, 2019; Yetim ve Tekiner, 2020). Proteinler vücutta başta yapım, onarım, büyüme ve gelişme olmak üzere pek çok metabolik işleve sahip bileşiklerdir. Bu nedenle, otoriteler bir kişinin günlük diyetle 1 kg

vücut ağırlığı başına 0.8 g protein almasını tavsiye etmektedir. Diğer taraftan, günlük diyetle alınacak protein miktarının en az %45'inin yüksek biyoyararlılığa sahip hayvansal kaynaklı proteinlerden oluşması gerektiği vurgulanmaktadır (Recommended Dietary Allowance (RDA), 2005). Peptitler, amino asitlerin peptit bağları aracılığıyla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu kısa zincirli polimerler olarak tanımlanmaktadır. Peptitlerin bünyesinde yer alan amino asitler, amino asit kalıntısı olarak adlandırılmakta olup, zincir uçlarında bulunan serbest α -amino ve α -karboksil grubuna sahip amino asit kalıntılarına sırasıyla amino terminal (N-terminali) ve karboksil terminal (C-terminali) adı verilmektedir. Peptit ve proteinlerin temel yapı taşları olan ve hücrelerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların birçoğunu katalizleyen amino asitler α -karbon atomuna bağlı bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$), bir hidrojen atomu (H) ve radikal gruptan (R) oluşmaktadır (Saldamlı ve Temiz, 2017; Hamzaoğlu, 2023). Doğada ortalama 300 adet amino asit bulunmakta olup, bu amino asitler arasından sadece 20 tanesi proteinlerin yapısına katılmaktadır (Bilişli, 2019). Protein yapısında yer almayan amino asitler sınıfına dahil edilen γ -aminobütirik asit (GABA, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$), L-glutamatın, glutamik asit dekarboksilaz enzimiyle parçalanması sonucu oluşmakta ve özellikle memeli canlılardaki en önemli nörotransmitter inhibitörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Diana ve ark., 2014; Das ve Goyal, 2015). GABA, merkezi sinir sisteminde sinaptik iletimi modüle etmede, nöronal gelişimi ve gevşemeyi desteklemede, uykusuzluk ve

depresyon problemini önlemede önemli bir rol oynamaktadır (Nuss, 2015; Knoflach ve ark., 2018). Ayrıca vücutta antihipertansif, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar, antialerjik, antimikrobiyal ve antidiyabetik etkiler sergileyen GABA, böbrek ve bağırsak fonksiyonları üzerinde de koruyucu etkilere sahiptir (Ngo ve Vo, 2019). Karnosin ($C_9H_{14}N_4O_3$), β -alanin ve L-histidinden oluşan bir dipeptit olarak tanımlanmaktadır (Cesak ve ark., 2023). Vücutta özellikle beyin ve kas dokularında bulunan karnosin, reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile hücresel düzeyde reaksiyona girerek biyomoleküllerin hasara uğramasını engellemektedir (Haus ve Thyfault, 2018). Ayrıca ileri glikasyon ve lipid peroksidasyon son ürünlerinin oluşumunu azaltan karnosin, protonlarla doğrudan reaksiyona girerek pH dengesini korumakta ve yoğun kas aktivitesinin neden olduğu yorgunluk hissini önemli düzeyde düşürmektedir (Dolan ve ark., 2018; Aldini ve ark., 2021). Anserin ($C_{10}H_{16}N_4O_3$) ise β -alanin ve 3-metilhistidinden oluşan, karnosin türevi bir dipeptittir (Yeum ve ark., 2010). Vücutta beyin ve kas dokularında bulunan anserin, Alzheimer hastalığının ve nörovasküler fonksiyon bozukluklarının tedavisinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Kaneko ve ark., 2017; Everaert ve ark., 2019). Bununla birlikte, anserin egzersiz kaynaklı hücre hasarını önlemekte ve kas dokularında biriken oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Alkhatip ve ark., 2020). Karnosinaz aktivitesini inhibe edebilen anserin bu sayede karnosinin etkinlik düzeyini de olumlu yönde desteklemektedir (Derave ve ark., 2019). Günlük diyetle karnosin ve anserinin birlikte kullanımı ise epizodik hafızayı güçlendirmekte ve

bilişsel bozuklukları önlemektedir (Hisatsune ve ark., 2016; Ding ve ark., 2018; Masuoka ve ark., 2019).

Halihazırda piyasaya sunulan protein kaynaklarının yüksek maliyetli olması ve artan nüfusun taleplerine karşılık verememesinin yanı sıra hayvansal üretim faaliyetlerinin çevre kirliliğine yol açması ve sera gazı emisyon oranını arttırarak iklim değişikliğinde önemli bir paya sahip olması nedeniyle farklı protein kaynaklarına yönelim artmıştır. Günümüzde dünya nüfusunun protein ihtiyacının karşılanmasında doğal, çevre dostu, uygun maliyetli ve sürdürülebilir özelliğe sahip *S. platensis* gibi farklı mikro alg türleri tüketime uygun hale getirilerek potansiyel protein kaynakları arasında gösterilmektedir (Hocquette ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2021). Ayrıca karbonhidrat içeriği de kısmen yüksek olan *S. platensis* gıdalarla birlikte tüketildiğinde sağlık açısından antimutajenik, antikarsinojenik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özellikler sergilemektedir (Zepka ve ark., 2019). Gıdaların protein ve/veya karbonhidrat içeriğinin yüksek olması, beslenme ve sağlık açısından bazı avantajlar sağladığı gibi bazı dezavantajları da beraberinde getirebilmektedir. Üretim esnasında mikrobiyal kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi ve muhafaza süresinin uzatılması amacıyla gıdalara uygulanan ısıtma işlemi, fermantasyon ve depolama süresinde amino grubu ve indirgen şekerler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonunun ileri aşamalarında şekerlerin termal bozunma ürünü olan 5-hidroksimetilfurfural (HMF) oluşumu gözlenebilmektedir (Li ve ark., 2019; Farag ve ark., 2020). Şekil 1’de karnosin, anserin, GABA ve HMF’nin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1. GABA, karnosin, anserin ve HMF'nin kimyasal yapısı
Figure 1. Chemical structure of GABA, carnosine, anserine and HMF

Literatürde Cui ve ark. (2020) pastörize süt, UHT süt, süt tozu, fermente süt, rekonstitüe süt ve rekonstitüe yoğurt örneklerinde; Czerwonka ve ark. (2020) mikro filtrelenmiş süt, UHT süt, pastörize süt ve sütü tozu örneklerinde; Xing ve ark. (2021) ise UHT süt ve pastörize yoğurt örneklerinde HMF içeriğini araştırmışlardır. Bununla birlikte, Siragusa ve ark. (2007) peynir örneklerinde; Renes ve ark. (2019) koyun sütünden üretilen olgunlaşmış peynir örneklerinde ve Galli ve ark. (2022) ise fermente süt örneklerinde GABA içeriğini incelemişlerdir. Bu bağlamda, literatürdeki çalışmalar incelendiğinde *S. platensis* ilave edilen kefirlerde fonksiyonel gıda olma özelliğini niteleyen GABA, karnosin ve anserin içeriklerinin yanı sıra ısıtma işlemi toksikantları arasında yer alan ve süte uygulanan ısıtma işleminin kalitesini niteleyen HMF ile HMF oluşumunda etkili olan indirgen şeker içeriğinin araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Böylece, sağlık açısından oldukça olumlu katkılar sağlayan kefirin *S. platensis* ile zenginleştirilmesinin bahsi geçen bileşenler üzerindeki etkisi detaylıca ele alınmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kefir örneklerine sırasıyla %0.5, %1 ve %1.5 oranında *S. platensis* ilave edilmiş ve GABA, karnosin, anserin, HMF ve indirgen şeker içerikleri kromatografik (LC-MS/MS) ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

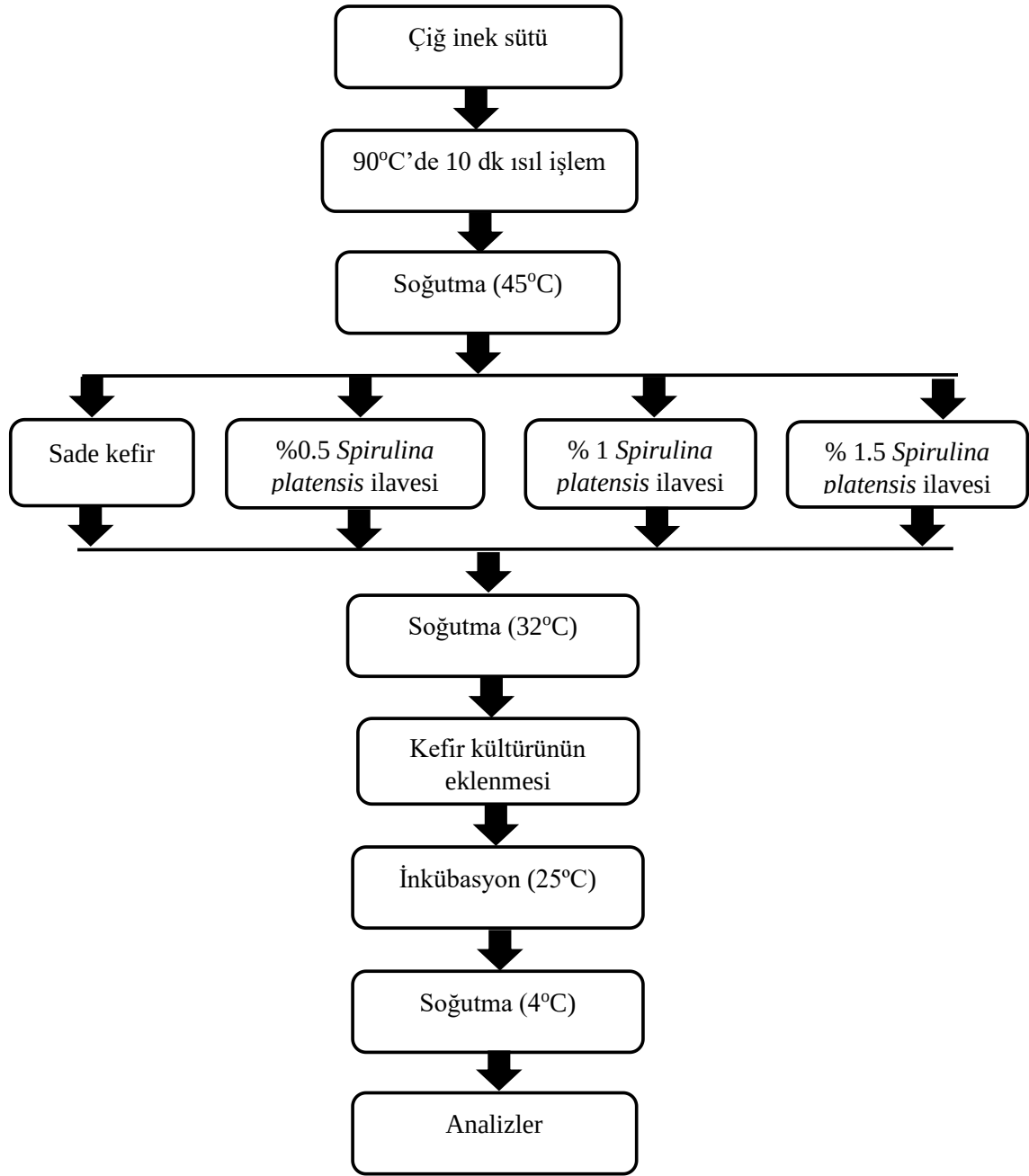
Kefir üretiminde kullanılan inek sütü Erzurum yerel üreticilerinden, *S. platensis* Naturiga Natural Foods (İstanbul, Türkiye) firmasından ve ticari kefir kültürü (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*) ise VİVO Gıda Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi (İstanbul, Türkiye)'den temin edilmiştir.

Metot

Kefir üretimi

Kefir üretiminde hammadde olarak kullanılan çiğ inek sütü, 90 °C'de 10 dk süreyle pastörize edilerek 45 °C'ye soğutulmuştur. Ardından %0.5, %1 ve %1.5 oranlarında *S. platensis* ilave edilip 32 °C'ye soğutulan örnekler DVS (Direct Vat Inoculation) esasına göre ticari kefir kültürü ilave edilmiştir. İnokülasyon aşamasından sonra kefir örnekleri, 25 °C'de pH 4.6 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. İnkübyasyon işlemi tamamlandıktan sonra kefir örneklerinde oluşan pıhtı kırılmış ve akabinde örnekler 4 °C'de depolanmıştır. Kefir

üretimin ait akış şeması Şekil 2’de detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 2. Kefir örneklerine ait üretim akış şeması
Figure 2. Production flow chart of kefir samples



Şekil 3. Kefir örnekleri (K: Sade kefir; KS-0.5: %0.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1: %1 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1.5: %1.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir)

Figure 3. Kefir samples (K: Plain kefir; KS-0.5: Kefir with 0.5% *S. platensis*; KS-1: Kefir with 1% *S. platensis*; KS-1.5: Kefir with 1.5% *S. platensis*)

5-hidroksimetilfurfural (HMF)

Kefir örneklerinin HMF içeriğinin belirlenmesinde, 5 mL kefir örneği üzerine 5 mL oksalik asit ilave edilip 1 saat boyunca su banyosunda bekletilerek oda sıcaklığına soğutulmuştur. Ardından elde edilen karışım filtre edildikten sonra süzüntüden 4 mL alınmış ve üzerine 1 mL 0.05 M tiyobarbitürik asit çözeltisi eklenerek tekrar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede (Optizen, Optizen POP, Güney Kore) 443 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Terzioğlu ve ark., 2023).

İndirgen şeker

Kefir örneklerinin dinitrosalisilik asit çözeltisi (DNS) yöntemine göre indirgen şeker içeriğinin belirlenmesinde, 5'er mL Carrez I (potasyum hekzasiyanoferat (II), %15) ve Carrez II (çinko sülfat heptahidrat, %30) çözeltileri kefir örneklerine ilave edilerek süzölmüş ve elde edilen süzöntü aktif kömürle 100 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım karanlıkta 1 saat süreyle bekletildikten sonra yeniden süzülerek 2 mL süzöntü elde edilmiş

ve 6 mL DNS çözeltisiyle 5 dk süreyle ısıtılarak spektrofotometrede (Optizen, Optizen POP, Güney Kore) 540 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Bakirci ve ark., 2023).

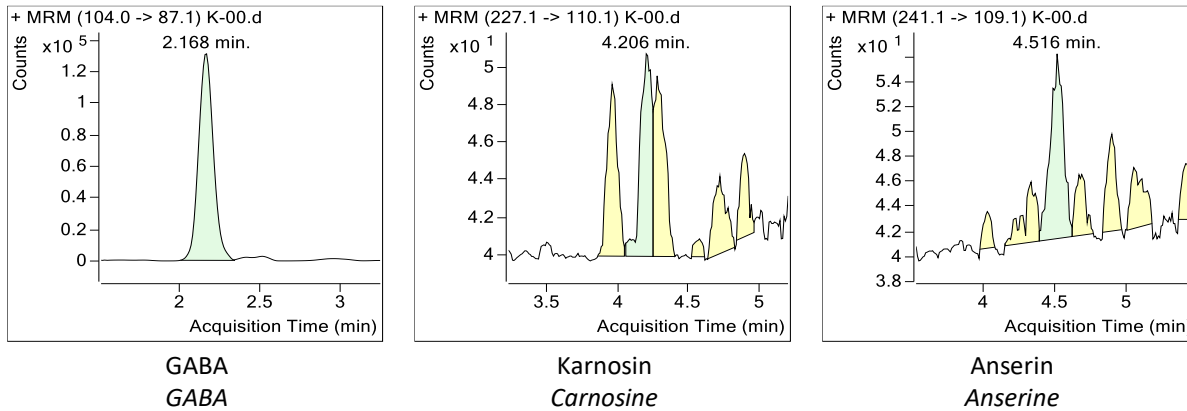
γ-aminobütirik asit (GABA), karnosin ve anserin içerikleri

Kefir örneklerinin GABA, karnosin ve anserin içerikleri belirlenirken Sıvı Kromatografi Tandem Kütle/Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) analizi için JASEM amino asit kiti kullanılmış olup, mobil faz akışında ise (0.7 mL dk⁻¹) gradient akış kullanılmıştır. Analizde kullanılan standartlar, internal standart, mobil faz ve kolon JASEM Laboratory Systems and Solutions tarafından temin edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ekstraksiyon işleminde 100 µL örnek, 50 µL internal standart ve 650 µL amino asit solvent (Mobil Faz A, Mobil Faz B, v:v, 1:4) karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Daha sonra LC-MS/MS (Agilent 6460 Triple Quadropol, ABD)'te analiz edilmiştir (Atila ve ark., 2021). LC-MS/MS kütle şartları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. LC-MS/MS Kütle Şartları
Table 1. LC-MS/MS Mass Conditions

Parametreler <i>Parameters</i>	(+) Değerler <i>(+) Values</i>	(-) Değerler <i>(-) Values</i>
Gaz sıcaklığı	150	150
Gaz akışı (L dk ⁻¹)	11	11
Nebulizer (psi)	40	40
Sheath gaz sıcaklığı	375	375
Sheath gaz akışı	11	11
Kapiler voltajı	2000	0
Enjeksiyon hacmi (µL)	1	
İyonlaşma gücü	AJS ESI	
İyonlaşma modu	Pozitif	

GABA, karnosin ve anserin bileşiklerinin standartlarına ait LC-MS/MS kromatogramları Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. GABA, karnosin ve anserin standartlarına ait LC-MS/MS kromatogramları
Figure 4. LC-MS/MS chromatograms of GABA, carnosine and anserine standards

İstatistiksel analiz

Kontrol grubuyla birlikte 3 farklı oranda (%0.5, %1 ve %1.5) *S. platensis* ilave edilen kefir örneklerine ait analizler 2 tekerrür olacak şekilde faktöriyel düzenlemede Tam Şansa Bağlı Bloklar Deneme Planına göre yürütülmüş ve veriler IBM® SPSS® Statistics Version 20.0 paket programında varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yorumlanmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Kefir örneklerinin HMF ve indirgen şeker içeriği sonuçları

Kefir örneklerinin HMF ve indirgen şeker içeriği

sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Kefir örneklerine *S. platensis* ilavesinin HMF oluşumu üzerinde istatistiksel olarak çok önemli ($p < 0.01$) etkiye sahip olduğu görülürken, indirgen şeker içeriği üzerinde ise önemli ($p < 0.05$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilave edilen *S. platensis* oranına bağlı olarak kefir örneklerinde HMF ve indirgen şeker içeriğinin arttığı saptanmıştır. Nitekim analiz sonuçlarına göre en yüksek HMF ($45.50 \mu\text{mol L}^{-1}$) ve indirgen şeker içeriği (%3.66) %1.5 oranında *S. platensis* ilave edilen kefir örneğinde, en düşük HMF ($18.15 \mu\text{mol L}^{-1}$) ve indirgen şeker içeriği (%3.66) ise *S. platensis* ilavesi yapılmayan kontrol grubu kefir örneğinde tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Kefir örneklerinin HMF ve indirgen şeker içerikleri
Table 2. HMF and reducing sugar contents of kefir samples

Kefir Örnekleri Kefir Samples	HMF ($\mu\text{mol L}^{-1}$) HMF ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	İndirgen Şeker (%) Reducing Sugar (%)
K	18.15 $\pm$ 1.70 ^c	2.34 $\pm$ 1.17 ^c
KS-0.5	35.91 $\pm$ 0.53 ^b	2.90 $\pm$ 0.09 ^b
KS-1	38.62 $\pm$ 1.60 ^b	3.18 $\pm$ 0.24 ^{ba}
KS-1.5	45.50 $\pm$ 0.48 ^a	3.66 $\pm$ 0.23 ^a
Sign.	**	*

a-c: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir; **: p<0.01; *: p<0.05; K: Sade kefir; KS-0.5: %0.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1: %1 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1.5: %1.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir

a-c: Different letters indicate significant differences in column; **: p<0.01; *: p<0.05; K: Plain kefir; KS-0.5: Kefir with 0.5% *S. platensis*; KS-1: Kefir with 1% *S. platensis*; KS-1.5: Kefir with 1.5% *S. platensis*

Amino grubu ve indirgen şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonunun ileri aşamalarında oluşan HMF, furfurallar grubuna ait bir bileşiktir. Glikoz, fruktoz, laktoz ve maltoz indirgen şeker olarak nitelendirilmekte olup, HMF oluşumunda oldukça önemli bir etkiye sahiptir (Bakirci ve ark., 2023). Maillard reaksiyonunun gerçekleşmesi için indirgen şeker ve amino asitler gerekli substratlar olup, dolayısıyla kefir gibi süt ürünlerinde indirgen şeker içeriğinin artışının furfural bileşiklerinin oluşumuna katkı sağladığı rapor edilmiştir (Xing ve ark., 2021). Nitekim mevcut araştırma sonuçlarından da görüldüğü üzere kefir örneklerine ait HMF değerlerinin, indirgen şeker içeriği sonuçlarıyla paralel bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştır. Cui ve ark. (2020) kırmızı hünnap aromalı rekonstitüe yoğurt örneğinde HMF içeriğini 3.430 mg kg⁻¹ olarak tespit ederlerken, fermente süt örneğinde 0.167 mg kg⁻¹ olarak saptamışlardır. Er Demirhan ve ark. (2015) devam sütü örneklerinde HMF içeriğini ortalama 237.85 $\mu\text{g 100 mL}^{-1}$ olarak tespit ederlerken, Terzioğlu ve Bakirci (2023) manda yoğurdunda 16.33 $\mu\text{mol L}^{-1}$, keçi yoğurdunda 21.59 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ve koyun yoğurdunda ise 17.81 $\mu\text{mol L}^{-1}$ olarak saptamışlardır.

Sütün karbonhidrat bileşiminin de Maillard reaksiyonu üzerinde etkili olduğu ve monosakkaritlerin indirgen disakkaritlere kıyasla reaksiyona daha kolay girebildiği bildirilmektedir (Özdal ve ark., 2018). Ayrıca heksozların asidik ortamda sıcaklığa maruz kalmasıyla da oluşabilen HMF içeriğinin, sütün laktoz ve glikoz içeriğinin yanı sıra, süt ürünlerinin üretimi esnasında uygulanan ısı işlem koşullarına, fermentasyon

sürecine ve ürüne ilave edilen katkıların protein ve şeker içeriğine bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Cui ve ark., 2020; Xing ve ark., 2020; Li ve ark., 2022; Terzioğlu ve ark., 2023). Nitekim, literatürde yapılan çalışmalarda *S. platensis*'in zengin bir protein içeriğine (%55-70) sahip olduğu ortaya konmuştur (Belay, 1997; Gün, 2019; Özbal, 2020). Ayrıca Mercan (2022), *S. platensis*'in karbonhidrat içeriğinin %13.5-15 arasında değiştiğini ve karbonhidrat içeriğinin başlıca glikoz, ramnoz, mannoz, galaktoz ve ksilozdan oluştuğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada, *S. platensis* ilaveli kefirlerde sade kefirlerle kıyasla indirgen şeker içeriğinin ve buna bağlı olarak HMF içeriğinin artması *S. platensis*'in karbonhidrat ve protein içeriğiyle ilişkilendirilmiştir.

Süt ürünlerinde HMF içeriğinin belirlenmesinin sağlık açısından önemli bir kalite parametresi olduğu ve HMF'nin genotoksik, sitotoksik ve tümöral özellikler sergilemesi nedeniyle belirli düzeylerde vücuda alındığında sağlık açısından risk teşkil edebileceği bildirilmiştir (Czerwonka ve ark., 2020; Van den Oever ve Mayer, 2021; Li ve ark., 2022). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) yayınladığı raporunda süt ürünlerinde bulunabilecek maksimum HMF miktarının 15 mg kg⁻¹ olduğunu bildirmiştir (Hou ve ark., 2022). Mevcut çalışmada ise kefir örneklerinin HMF miktarlarının, EFSA tarafından bildirilen bu sınırın altında olduğu ortaya konmuştur.

Kefir örneklerinin GABA, karnosin ve anserin içerikleri

Kefir örneklerinin GABA, karnosin ve anserin içeriği sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir. Kefir örneklerine *S. platensis* ilavesinin istatistiksel

olarak GABA ve karnosin içerikleri üzerinde çok önemli ($p<0.01$) etkiye sahip olduğu, anserin üzerinde ise önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Kefir örneklerine ilave edilen *S. platensis* oranına bağlı olarak GABA ve karnosin içeriğinin arttığı, anserin içeriğinin ise düzenli bir artış göstermediği saptanmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre kefir örnekleri arasında en yüksek GABA içeriği ($2055.12 \text{ nmol mL}^{-1}$) ve karnosin

içeriği ($16.01 \text{ nmol mL}^{-1}$) %1.5 oranında *S. platensis* ilave edilen kefir örneğinde, en yüksek anserin içeriği ($17.38 \text{ nmol mL}^{-1}$) ise %1 oranında *S. platensis* ilave edilen kefir örneğinde tespit edilmiştir. En düşük GABA içeriği ($544.52 \text{ nmol mL}^{-1}$), karnosin içeriği ($8.03 \text{ nmol mL}^{-1}$) ve anserin içeriği ($12.21 \text{ nmol mL}^{-1}$) ise *S. platensis* ilavesi yapılmayan kontrol grubu kefir örneğinde tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Kefir örneklerinin GABA, karnosin ve anserin içerikleri
Table 3. GABA, carnosine and anserine contents of kefir samples

Kefir Örnekleri Kefir Samples	GABA (nmol mL^{-1}) GABA (nmol mL^{-1})	Karnosin (nmol mL^{-1}) Carnosine (nmol mL^{-1})	Anserin (nmol mL^{-1}) Anserine (nmol mL^{-1})
K	544.52±4.51 ^d	8.03±0.84 ^b	12.21±0.33 ^b
KS-0.5	1310.62±5.69 ^c	10.51±0.51 ^b	12.41±0.78 ^b
KS-1	1709.42±40.77 ^b	15.32±1.63 ^a	17.38±0.37 ^a
KS-1.5	2055.12±5.37 ^a	16.01±0.12 ^a	16.78±3.32 ^{ba}
Sign.	**	**	ns

a-d: sütunlar arasındaki farklılıkları gösterir; **: $p<0.01$; ns: not significant; K: Sade kefir; KS-0.5: %0.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1: %1 oranında *S. platensis* ilaveli kefir; KS-1.5: %1.5 oranında *S. platensis* ilaveli kefir

a-d: Different letters indicate significant differences in column; **: $p<0.01$; ns: not significant; K: Plain kefir; KS-0.5: Kefir with 0.5% *S. platensis*; KS-1: Kefir with 1% *S. platensis*; KS-1.5: Kefir with 1.5% *S. platensis*

GABA, dört karbon atomuna sahip protein olmayan bir amino asit olarak nitelendirilmekte olup, sentezi L-glutamik asit veya tuzlarından glutamik asit dekarboksilaz enzimi ve kofaktör piridoksal-5-fosfat tarafından gerçekleşmektedir (Sahab ve ark., 2020). Laktik asit bakterileri ve mayalar GABA üretebilme yeteneklerine sahiptir ve ticari olarak GABA üretiminde kullanılmaktadır (Diana ve ark., 2014; Oketch-Rabah ve ark., 2021). *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactocaseibacillus paracasei* ve *Lactiplantibacillus plantarum* gibi çeşitli laktik asit bakterileri glutamik asit dekarboksilaz enzimi aktivitesine sahip olmaları nedeniyle GABA üretimi için sıklıkla tercih edilmektedir (Sahab ve ark., 2020). Bununla birlikte süt ve süt ürünlerinde, kazeinin zengin glutamik asit kaynağı olması nedeniyle GABA'nın doğal olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Yılmaz-Ersan ve ark., 2022). Ayrıca laktik asit fermentasyonu ile üretilen gıdalar GABA açısından doğal kaynaklar arasında gösterilmekte ve bu gıdaların tüketimi ile düzenli bir şekilde vücuda yüksek miktarda GABA'nın alınabileceği

bildirilmektedir (Diana ve ark., 2014).

Gharehyakheh (2021) koyun sütü ve kiraz meyvesi kullanarak ürettiği kefir örneklerine *Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1* (GQ451633) ilavesi yaparak GABA içeriğini incelemiştir. Optimum koşullar altında kefir örneklerinde ortalama GABA üretimini 3.818 mg mL^{-1} olarak belirlemiştir. Ayrıca kiraz meyvesinin bileşiminde bulunan glikoz ve fruktoz oranının GABA üretimini arttırdığını ifade etmiştir. Mevcut çalışmada da indirgen şeker miktarı ile GABA içeriğinin paralel şekilde arttığı tespit edilmiştir. Hussin ve ark. (2021) basit şeker ve *Lactiplantibacillus plantarum* Taj-Apis 362 kullanarak ürettikleri yoğurt örneklerinde GABA içeriğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda glikoz ilaveli yoğurt örneklerinin en yüksek probiyotik bakteri sayısına ($9.31 \log \text{ kob g}^{-1}$) ve GABA içeriğine ($58.56 \text{ mg } 100^{-1}$) sahip olduğunu belirlemişlerdir. Inoue ve ark. (2003) hafif hipertansiyonu olan hastalara GABA içeren fermente süt ürününün 12 hafta boyunca her gün 100 mL verilmesinin hastalarda kan basıncını düşürme potansiyeline sahip olduğu bildirmişlerdir. Nejati ve ark. (2013) farklı laktik asit

bakterileri kullanarak ürettikleri fermente sütlerde GABA içeriklerinin 10.1-77.4 mg kg⁻¹ arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar fermente sütlerin GABA içeriklerindeki farklılıkları suşların GABA sentezleme kapasitelerinin farklı olmasıyla ve sütün asidifikasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Khanlari ve ark. (2021) ürettikleri fermente süt örneklerinde GABA içeriğinin fermentasyon işlemiyle 18 mg L⁻¹'den 136 mg L⁻¹'ye kadar yükseldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar fermente ürünlerde GABA içeriğinin bileşim, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, GABA prekürsörlerinin bulunması ve mikroorganizma inokülasyon oranı gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğini bildirmişlerdir. Yılmaz-Ersan ve ark. (2022) kestane sütü ile zenginleştirdikleri yoğurt örneklerinde kestanenin GABA içeriğinin yüksek olması nedeniyle yoğurt örneklerinde GABA içeriğinin arttığını rapor etmişlerdir. Mevcut araştırmada ise kefir örneklerindeki *S. platensis* ilavesiyle GABA içeriğinin artmasında *S. platensis*'in baskın amino asitleri arasında glutamik asidin (8.47 g 100 g⁻¹) yer almasının etkili olduğu düşünülmektedir (Bashir ve ark., 2016). Garbowska ve ark. (2020) farklı *Lactobacillus* suşlarıyla ürettikleri peynir örneklerinde olgunlaşma periyodu boyunca anserin ve karnosin miktarlarındaki artışları incelemişlerdir. Araştırmacılar laktik asit bakterinin faaliyetleri sonucunda tüm peynir örneklerinde anserin ve karnosin peptitlerini tespit etmişlerdir. Bartkiene ve ark. (2023) *Spirulina*'nın fermente edilen ve fermente edilmeyen suşlarındaki GABA miktarlarını incelemişlerdir. Fermente edilen *Spirulina*'yı GABA üretebilen *Lactiplantibacillus plantarum* No. 122 suşu ile fermentasyon işlemine tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar tüm örneklerde belirli miktarlarda GABA belirlemiş olup, en yüksek GABA içeriğini fermente edilmiş *Spirulina*'da ortalama 228.6 mg kg⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.

Sonuç

Zengin bir protein kaynağı olan ve çevre dostu kimliğiyle ön plana çıkan *S. platensis*, kefir gibi doğal probiyotik ürünlere ilave edilerek beslenme

açısından birtakım avantajlar sağlamaktadır. Bileşiminde bulunan çeşitli amino asitler, peptitler ve nörotransmitter maddeler insan sağlığının korunması açısından önem teşkil etmektedir. GABA, karnosin ve anserin gibi bileşenlerin günlük diyetle gıdalarla birlikte düzenli bir şekilde alınması sonucu birçok hastalığın önlenildiği ve zihinsel gelişim açısından olumlu katkılar sağlanabildiği bildirilmektedir. Fakat *S. platensis* ile zenginleştirilen kefirlerin proteince zengin olması ve üretim prosesi esnasında ısı ileme maruz kalması, HMF'nin oluşumu gibi bazı dezavantajları da beraberinde getirebilmektedir. Mevcut araştırmada, protein içeriğinin zenginleştirilmesi amacıyla kefir örneklerine farklı oranlarda *S. platensis* ilavesinin HMF ve indirgen şeker içeriğinin yanı sıra GABA, karnosin ve anserin içeriği üzerine etkisi incelenmiştir. Kefir örneklerinde *S. platensis* ilavesiyle indirgen şeker, HMF, GABA ve karnosin içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, mevcut araştırmada HMF içeriğinin tüm kefir örneklerinde EFSA tarafından belirtilen limitlerin altında olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, HMF içeriği açısından risk teşkil etmeyen *S. platensis* ilaveli kefirlerin biyoaktif bileşikler olan GABA, karnosin ve anserinin vücuttaki fizyolojik işlevlerinden yararlanabilmek adına tüketimi tavsiye edilebilmektedir.

Kaynakça

- Aktaş, B. (2022). *Spirulina platensis* ilave edilerek üretilen kefirin besin içeriğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aldini, G., de Courten, B., Regazzoni, L., Gilardoni, E., Ferrario, G., Baron, G., Altomare, A., D'Amato, A., Vistoli, G., & Carini, M. (2021). Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radical Research*, 55(4), 321-330.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1856830>
- Alkhatip, A., Feng, W. H., Huang, Y. J., Kuo, C. H., & Hou, C. W. (2020). Anserine reverses exercise-induced oxidative stress and preserves cellular homeostasis in healthy men. *Nutrients*, 12(4), 1146. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12041146>

- Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 340-345. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.981588>
- Atila, A., Alay, H., Yaman, M. E., Akman, T. C., Cadirci, E., Bayrak, B., Celik, S., Atila, N. E., Yaganoglu, A. M., Kadioglu, Y., Halıcı, Z., Parlak, E., & Bayraktutan, Z. (2021). The serum amino acid profile in COVID-19. *Amino Acids*, 53(10), 1569-1588. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03081-w>
- Bakirci, İ., Terzioğlu, M. E., & Akkaya, İ. (2023). Volatile compounds, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, HMF content and microstructure of fruit yoghurts. *Mljekarstvo*, 73(4), 250-262. DOI: <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2023.0404>
- Bartkiene, E., Tolpeznikaite, E., Klupsaite, D., Starkute, V., Bartkevics, V., Skrastina, A., Pavlenko, R., Mockus, E., Lele, V., Batkeviciute, G., Budrikyte, A., Janulyte, R., Jomantaite, I., Kybartaitė, A., Knystautaitė, K., Valionyte, A., Ruibys, R., & Rocha, J. M. (2023). Bio-converted *Spirulina* for nutraceutical chewing candy formulations rich in L-glutamic and gamma-aminobutyric acids. *Microorganisms*, 11(2), 441. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020441>
- Bashir, S., Sharif, M. K., Butt, M. S., & Shahid, M. (2016). Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences*, 59(1), 12-19. DOI: <https://doi.org/10.52763/PJSIR.BIOL.SCI.59.1.2016.12.19>
- Belay, A. (1997). Mass culture of *Spirulina* outdoors. The earthrise farms experience. In: Vonshak A (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*, 1st edn. (pp. 131-158). Taylor & Francis.
- Bilişli, A. (2019). *Gıda Kimyası*. İzmir: Sidas Yayınları.
- Cesak, O., Vostalova, J., Vidlar, A., Bastlova, P., & Student, V. (2023). Carnosine and beta-alanine supplementation in human medicine: narrative review and critical assesment. *Nutrients*, 15(7), 1770. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu15071770>
- Cui, Y., Shi, X., Tang, Y., Xie, Y., & Du, Z. (2020). The effects of heat treatment and fermentation processes on the formation of furfurals in milk-based dairy products using a QuEChERS technique followed by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 313, 125930. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125930>
- Czerwinka, M., Pietrzak-Sajjad, R., & Bobrowska-Korczak, B. (2020). Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in market milk products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(7), 1135-1144. DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1757162>
- Das, D., & Goyal, A. (2015). Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 263-268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.013>
- Derave, W., De Courten, B., & Baba, S. P. (2019). An update on carnosine and anserine research. *Amino Acids*, 51, 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-02689-9>
- Diana, M., Quilez, J., & Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, 10, 407-420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.004>
- Ding, Q., Tanigawa, K., Kaneko, J., Totsuka, M., Katakura, Y., Imabayashi, E., Matsuda, H., & Hisatsune, T. (2018). Anserine/carnosine supplementation preserves blood flow in the prefrontal brain of elderly people carrying APOE e4. *Aging and Disease*, 9(3), 334-345. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0809>
- Dolan, E., Saunders, B., Dantas, W. S., Murai, I. H., Roschel, H., Artioli, G. G., Harris, R., Bicudo, J. E. P. W., Sale, C., & Gualano, B. (2018). A comparative study of hummingbirds and chickens provides mechanistic insight on the histidine containing dipeptide role in skeletal muscle metabolism. *Scientific Reports*, 8, 14788. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32636-3>
- Er Demirhan, B., Demirhan, B., Sönmez, C., Torul, H., Tamer, U., & Yentür, G. (2015). Determination of potential 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 818-822. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8761>
- Everaert, I., Baron, G., Barbaresi, S., Gilardoni, E., Coppa, C., Carini, M., Vistoli, G., Bex, T., Stautemas, J., Blancaquaert, L., Derave, W., Aldini, G., & Regazzoni, L. (2019). Development and validation of a sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of anserine in human plasma and urine and its application to pharmacokinetic study. *Amino Acids*, 51, 103-114. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2663-y>
- Farag, M. R., Alagawany, M., Bin-Jumah, M., Othman, S. I., Khafaga, A. F., Shaheen, H. M., Samak, D., Shehata, A. M., Allam, A. A., & Abd El-Hack, M. E. (2020). The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: a review. *Molecules*, 25(8), 1941. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25081941>
- Galli, V., Venturi, M., Mari, E., Guerrini, S., & Granchi, L. (2022). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in fermented milk by lactic acid bacteria isolated from spontaneous raw milk fermentation. *International Dairy Journal*, 127, 105284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105284>
- Garbowska, M. Pluta, A., & Berthold-Pluta, A. (2020). Contents of functionally bioactive peptides, free amino acids, and biogenic amines in Dutch-type cheese models produced with different *Lactobacilli*. *Molecules*, 25(22), 5465. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25225465>

- Gharehyakheh, S. (2021). Gamma aminobutyric acid (GABA) production using *Lactobacillus* sp. *Makhdzir Naser-1* (GQ451633) in the cherry-kefir beverage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15521. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15521>
- Gün, D. (2019). *Spirulina platensis ilavesi ile fonksiyonel bisküvi ve kraker geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Hamzaoglu, F. (2023). *Amino asitlerle zenginleştirilmiş nar ve portakaldan oluşan karışık meyve suyunun depolama boyunca antosiyanin stabilitesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Haus, J. M., & Thyfault, J. P. (2018). Therapeutic potential of carbonyl-scavenging carnosine derivative in metabolic disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(12), 5198-5200. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI124304>
- Hisatsune, T., Kaneko, J., Kurashige, H., Cao, Y., Satsu, H., Totsuka, M., Katakura, Y., Imabayashi, E., & Matsuda, H. (2016). Effect of anserine/carnosine supplementation on verbal episodic memory in elderly people. *Journal of Alzheimer's Disease*, 50(1), 149-159. DOI: <https://doi.org/10.3233/JAD-150767>
- Hocquette, A., Lambert, C., Siquin, C., Peterloff, L., Wagner, Z., Bonny, S. P. F., Lebert, A., & Hocquette, J. F. (2015). Educated consumers don't believe artificial meat is the solution to the problems with the meat industry. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 273-284. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60886-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60886-8)
- Hou, Y., Zhang, X., Liu, X., Wu, Q., Hou, J., Su, P., & Guo, Q. (2022). Comparison of the effects of 5-hydroxymethylfurfural in milk powder matrix and standard water on oxidative stress system of Zebrafish. *Foods*, 11(12), 1814. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11121814>
- Hussin, F. S., Chay, S. Y., Hussin, A. S. M., Ibadullah, W. Z. W., Muhialdin, B. J., Ghani, M. S. A., & Saari, N. (2021). GABA enhancement by simple carbohydrates in yoghurt fermented using novel, self-cloned *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 and metabolomics profiling. *Scientific Reports*, 11, 9417. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88436-9>
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Ames: Blackwell Publishing.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(3), 490-495. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601555>
- Kaneko, J., Enya, A., Enomoto, K., Ding, Q., & Hisatsune, T. (2017). Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged A β PPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Scientific Reports*, 7, 12571. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12785-7>
- Khanlari, Z., Moayedi, A., Ebrahimi, P., Khomeiri, M., & Sadeghi, A. (2021). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) content in fermented milk by using *Enterococcus faecium* and *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15869. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15869>
- Knoflach, F., Hernandez, M. C., & Bertrand, D. (2018). Methods for the discovery of novel compounds modulating a gamma-aminobutyric acid receptor type a neurotransmission. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 138, e57842. DOI: <https://doi.org/10.3791/57842>
- Li, M., Shen, M., Lu, J., Yang, J., Huang, Y., Liu, L., Fan, H., Xie, J., & Xie, M. (2022). Maillard reaction harmful products in dairy products: formation, occurrence, analysis, and mitigation strategies. *Food Research International*, 151, 110839. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110839>
- Li, Y. H., Wang, W. J., Guo, L., Shao, Z. P., & Xu, X. J. (2019). Comparative study on the characteristics and oxidation stability of commercial milk powder during storage. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8785-8797. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16089>
- Masuoka, N., Yoshimine, C., Hori, M., Tanaka, M., Asada, T., Abe, K., & Hisatsune, T. (2019). Effects of anserine/carnosine supplementation on mild cognitive impairment with APOE4. *Nutrients*, 11(7), 1626. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11071626>
- Mercan, F. (2022). *Spirulina (Arthrospira) platensis biyokütlesinin laktik asit fermentasyonu için substrat olma potansiyelinin değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 183-189. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.017>
- Ngo, D. H., & Vo, T. S. (2019). An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules*, 24(15), 2678. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24152678>
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 165-175. DOI: <https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>
- Oketch-Rabah, H. A., Madden, E. F., Roe, A. L., & Betz, J. M. (2021). United States Pharmacopeia (USP) safety review of gamma-aminobutyric acid (GABA). *Nutrients*, 13(8), 2742. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13082742>
- Özbal, B. (2020). *Spirulina platensis ile fonksiyonel çikolata ürünü geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Özdal, H. R., Yildiz, B., & Arkun, G. (2018). Hydroxymethylfurfural (HMF) formation in milk and dairy

- products. *International Journal of Food Engineering Research*, 4(1), 13-23.
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J. A., & De Noni, I. (2013). Nutritional quality of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition, 515-538.
- Recommended Dietary Allowance (RDA), (2005). Institute of Medicine. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: The National Academies Press. Retrieved from: <https://doi.org/10.17226/10490>
- Reyes, E., Ladero, V., Tornadijo, M. E., & Fresno, J. M. (2019). Production of sheep milk cheese with high γ -aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. *Food Microbiology*, 78, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.003>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Sahab, N. R., Subroto, E., Balia, R. L., & Utama, G. L. (2020). γ -Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: current trends. *Heliyon*, 6(11), e05526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05526>
- Saldamlı, İ., & Temiz, A. (2017). Amino asitler, peptitler, proteinler. Saldamlı, İ. (Ed.), *Gıda Kimyası*, (pp. 227-317). Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7283-7290. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07>
- Terzioğlu, M. E., & Bakırcı, İ. (2023). Comparison of buffalo's, sheep's and goat's yoghurts in terms of their antioxidant activity, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, volatile compound content and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) content. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 79(3), 148-152. DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6727](https://doi.org/10.21521/mw.6727)
- Terzioğlu, M. E., Arslaner, A., & Bakırcı, İ. (2023). Çilekle zenginleştirilmiş manda yoğurdunun kalite karakteristikleri ile yağ asidi kompozisyonu, ACE inhibitör aktivite ve HMF içeriği bakımından incelenmesi. *Gıda*, 48(2), 381-393. DOI: <https://doi.org/10.15237/gida.GD22101>
- Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Aranguren, P., Irigoyen, A., Marzo, F., & Ibáñez, F. C. (2007). Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*, 27(10), 653-658. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.08.002>
- Van den Oever, S. P., & Mayer, H. K. (2021). Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121, 105097. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105097>
- Xing, Q., Fu, X., Liu, Z., Cao, Q., & You, C. (2021). Contents and evolution of potential furfural compounds in milk-based formula, ultra-high temperature milk and pasteurised yoghurt. *International Dairy Journal*, 120, 105086. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105086>
- Xing, Q., Ma, Y., Fu, X., Cao, Q., Zhang, Y., & You, C. (2020). Effects of heat treatment, homogenization pressure, and overprocessing on the content of furfural compounds in liquid milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 5276-5282. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10578>
- Yetim, H., & Tekiner İ. H. (2020). Alternatif protein kaynaklarından yapay et üretimi kavramına eleştirel bir bakış. *Helal ve Etik Araştırmalar Dergisi*, 2(2), 85-100.
- Yeum, K. J., Orioli, M., Regazzoni, L., Carini, M., Rasmussen, H., Russell, R. M., & Aldini, G. (2010). Profiling histidine dipeptides in plasma and urine after ingesting beef, chicken or chicken broth in humans. *Amino Acids*, 38, 847-858. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0291-2>
- Yilmaz-Ersan, L., Sahin, S., Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Usta-Gorgun, B., Ciniviz, M., & Keser, G. (2022). Interaction of probiotic activity, antioxidative capacity, and gamma-amino butyric acid (GABA) in chestnut milk-fortified yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12), e17266. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.17266>
- Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., & Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>
- Zhang, L., Hu, Y., Badar, I. H., Xia, X., Kong, B., & Chen, Q. (2021). Prospects of artificial meat: Opportunities and challenges around consumer acceptance. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 434-444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.01>