

T.C.  
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

SOĞUK PRESLENMİŞ AYÇİÇEĞİ POSASI İLE  
BEYAZ VEYA KAŞAR PEYNİR ALTI SUYUNDAN  
ENZİMATİK HİDROLİZLE HAZIRLANAN PROTEİN  
HİDROLİZATLARININ BİYOAKTİF  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE MODEL  
GIDA ÜRÜNLERİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve GENÇ

İstanbul  
Ekim-2024

T.C.  
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

SOĞUK PRESLENMİŞ AYÇİÇEĞİ POSASI İLE BEYAZ  
VEYA KAŞAR PEYNİR ALTI SUYUNDAN ENZİMATİK  
HİDROLİZLE HAZIRLANAN PROTEİN  
HİDROLİZATLARININ BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ VE MODEL GIDA ÜRÜNLERİNDE  
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve GENÇ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

İstanbul

Ekim-2024

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Doç. Dr. Banu METİN

Üye Dr. Öğr. Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER

Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “Soğuk Preslenmiş Ayçiçeği Posası ile Beyaz veya Kaşar Peynir Altı Suyundan Enzimatik Hidrolizle Hazırlanan Protein Hidrolizatlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi ve Model Gıda Ürünlerinde Değerlendirilmesi” adlı çalışmamın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Merve GENÇ

## ÖNSÖZ

TÜBİTAK 1001 programı destek projesi kapsamında, değerli hocam Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'nin proje yürütücüğünü gerçekleştirdiği; 'gıda üretim, depolama ve sindirim süreçlerinin biyoaktif peptit kararlılığına etkisi ve bu etkinin model gıda ürünlerinde incelenmesi' isimli çalışmada araştırmacı olarak bana çalışma imkânı sunan TÜBİTAK'a ve projesinde yer almama vesile olan ve araştırmalarım boyunca bir an olsun desteğini benden esirgemeyen pek kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım ve öğrenim sürecimde bana yardımcı olan ve bana destek olan Biyokimyager Bilal ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar alanında dersleriyle bize vizyon katan çok değerli hocamız Arş. Gör. Zeynep Saliha GÜNEŞ'e, teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini bir an olsun esirgemeyen ve yoluma ışık tutan canım babam Melik GENÇ ve canım annem Naciye GENÇ'e, sonsuz şükranlarımı sunarım.

Manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen kıymetli ablalarım; Hümeysra GENÇ BOZTEPE, Büşra GENÇ KARABULUT ve biricik kardeşim Muhammed Can GENÇ'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Yüksek lisansın bana kazandırdığı, maddi ve manevi olarak birbirimizin yanında olduğumuz, güzel dostlarım Gıda Yüksek Mühendisi Ebru AL, Gıda Yüksek Mühendisi Gökçe ASAN, Gıda Yüksek Mühendisi Büşra TOSUN, Gıda Yüksek Mühendisi Merve Esra ÜNGÖR ve Gıda Yüksek Mühendisi Kübra TAYFUR'a çok teşekkür ederim.

**Merve GENÇ**  
**İstanbul-2024**

**ÖZET**

**SOĞUK PRESLENMİŞ AYÇİÇEĞİ POSASI İLE BEYAZ  
VEYA KAŞAR PEYNİR ALTI SUYUNDAN ENZİMATİK  
HİDROLİZLE HAZIRLANAN PROTEİN  
HİDROLİZATLARININ BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ VE MODEL GIDA ÜRÜNLERİNDE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Merve GENÇ**

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Ekim, 2024 -155 Sayfa

Günümüzde teknolojinin gelişmesi ve globalleşme sonucunda protein ihtiyacının giderek arttığı gözlemlenmektedir. Bu nedenle gıda yan ürünlerinin değerlendirilmesiyle elde edilen ek protein kaynaklarına olan ihtiyaç da artmaktadır. Bu çalışmanın amacı bitkisel ve hayvansal kökenli, toksik özellikleri olmayan, gıda ile gıda takviyelerinde kullanıma uygun biyoaktif peptit fraksiyonları üretmek ve bu peptitlerin antidiyabetik ve antihipertansif etkinliği *in vitro* yöntemlerle incelemektir. Ayrıca, *in vitro* biyoaktivite gösteren peptit fraksiyonlarının, model fonksiyonel gıda ürünlerinin üretim, depolama ve sindirim süreçlerindeki kararlılıkları da analiz edilmiştir. Bu doğrultuda uygun fraksiyonlama teknikleri ile bu peptitler ayrıştırılmış ve konsantre edilmiştir.

Bu çalışmada ayçiçeği çekirdeği bitkisel protein hidrolizatlarının yanı sıra hayvansal kaynaklı beyaz ve kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatları da kullanılmış ve benzer amaçlarla değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım çerçevesinde, zirai ve endüstriyel sektörlerimizden çıkan yan ürünlerin başka sektörlerimizde katma değere dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Örneğin ayçiçek yağı üretiminden arta kalan posa ve peynir üretiminden arta kalan peynir altı suyu, gıda üretiminde kullanılma potansiyeline sahip değerli yan ürünlerdir. Bu maddelerden elde edilen yenilikçi ürünler, farklı gıda maddelerinde kullanılabilir. Bu amaçla ayçiçeği

protein izolatu ile beyaz ve kaşar peynir üretiminden elde edilen endüstriyel peynir altı suyundan protein konsantreleri uygun tekniklerle parçalanarak üç farklı gıda maddesine (ekmek, yoğurt ve vegan köfte) eklenmiştir. Depolama boyunca bu ürünlerden alınan örnekler üzerinden biyoaktif özellikleri değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ayçiçeği Proteini, Peynir Altı Suyu Proteini, ACE, DPP-IV, Biyoaktif Peptit



**ABSTRACT**

**DETERMINATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF  
PROTEIN HYDROLYSATES PREPARED BY ENZYMATIC  
HYDROLYSIS FROM COLD PRESSED SUNFLOWER MEAL  
AND WHITE OR CHEDDAR CHEESE WHEY AND  
EVALUATION IN MODEL FOOD PRODUCTS**

**Merve GENÇ**

Master of Science, Food Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Prof. İbrahim GÜLSEREN

Nov, 2024- 155 Pages

With the advancements in technology and globalization, the growing demand for protein has become increasingly evident. Consequently, there is a need for additional protein sources obtained through the valorization of food by-products. The aim of this study is to produce bioactive peptide fractions of plant and animal origin, free of toxic properties, suitable for use in food and dietary supplements, and to investigate their antidiabetic and antihypertensive activities through in vitro methods. Furthermore, the stability of these bioactive peptide fractions during the production, storage, and digestion processes of model functional food products was analyzed. These peptides were fractionated and concentrated using appropriate fractionation techniques.

In this study, plant-based protein hydrolysates derived from sunflower seed pomace and animal-based protein hydrolysates obtained from whey of white and cheddar cheeses were utilized and evaluated for similar purposes. This approach aims to transform by-products from agricultural and industrial sectors into value-added products for other sectors. For example, sunflower seed pomace, a by-product of sunflower oil production, and whey, a by-product of cheese production, are valuable resources with potential for use in food production. Innovative products derived from these materials can be incorporated into various food items. To achieve this, sunflower protein isolate and protein concentrates obtained from industrial whey from white and cheddar cheese production were enzymatically hydrolyzed and incorporated into three

different food products (bread, yogurt, and vegan meatballs). Samples were collected throughout storage, and their bioactive properties were evaluated.

**Keywords:** Sunflower Proteins, Whey Proteins, ACE, DPP-IV, Bioactive Peptides



# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	i
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR.....	xv
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
GİRİŞ .....	1
İKİNCİ BÖLÜM.....	5
LİTERATÜR TARAMASI .....	5
2.1. Proteinler .....	5
2.1.1. Amino Asitler ve Peptitler .....	7
2.1.2. Alternatif Protein Kaynağı Olarak Yağlı Tohumlar .....	7
2.2. Ayçiçeği .....	8
2.2.1. Dünya Ayçiçeği Pazarı ve Türkiye'deki Durumun İncelenmesi.....	9
2.2.2. Ayçiçeği Protein İzolatı .....	10
2.2.3. Ayçiçeği Protein Hidrolizatlarının Hazırlanması .....	10
2.2.4. Ayçiçeği Proteinleri Eldesi .....	11
2.2.5. Ayçiçeği Proteinlerinin Teknik ve Fonksiyonel Özellikleri.....	11
2.2.6. Ayçiçeği Proteinlerinin Diğer Maddelerle Etkileşimleri ve Stabilitesi ....	13
2.3. Peynir Altı Suyu Proteinleri .....	13
2.3.1. Yüksek Katma Değerli Bileşen Olarak Peynir Altı Suyu Proteinleri.....	15
2.3.2. Dünya Peynir Altı Suyu Pazarı ve Türkiye'deki Durumun İncelenmesi..	16

2.3.3. Peynir Altı Suyu Ultra Filtrasyonu (UF) .....	16
2.3.4. Peynir Altı Suyu Hidrolizatlarının Hazırlanması.....	17
2.3.5. Peynir Altı Suyu Proteinleri Eldesi.....	17
2.3.6. Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Teknik ve Fonksiyonel Özellikleri .....	17
2.3.7. Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Benzerlik ve Farklılıkları .....	26
2.3.8. Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Diğer Maddelerle Etkileşimleri ve Stabilitesi.....	27
2.4. Biyoaktif Peptitler .....	27
2.4.1. Biyoaktif Peptitlerin Tanımlanması ve Karakterizasyonu.....	29
2.4.1.1. Antihipertansif Peptitler.....	29
2.4.1.2. Antidiyabetik Peptitler.....	30
2.4.1.3. Covid 19 Önleyici Aktivite.....	31
2.4.2. Biyoaktif Peptit Üretimi, Konsantre Edilmesi ve Saflaştırılması.....	31
2.4.3. Biyoaktif Peptitlerin Biyolojik Fonksiyonelliklerinin İncelenmesi.....	31
2.4.4. Biyoaktif Peptitlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı .....	32
2.4.4.1. Ekmek .....	32
2.4.4.2. Yoğurt.....	33
2.4.4.3. Vegan Köfte.....	34
2.5. Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Çalışmaları .....	35
<b>ÜÇÜNCÜ BÖLÜM .....</b>	<b>36</b>
<b>MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	36
3.2. Kullanılan Teçhizat .....	38
3.2.1. Ultrafiltrasyon (UF) Membranları .....	49
3.2.2. Kjeldahl Yöntemi.....	49

3.2.3. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) .....	49
3.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	50
3.3. Analiz Yöntemleri .....	50
3.3.1. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Konsantrelerinin Eldesi .....	50
3.3.2. Ayçiçeği, Beyaz veya Kaşar Peynir Altı Suyu Protein İzolatlarının Hidrolizi .....	53
3.3.3. Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi (%HD), Nem ve Kül Tayini	54
3.3.4. Hidrolizatların Ultrafiltrasyon (UF) ile Fraksiyonlanması .....	56
3.4. Protein Hidrolizatlarının Biyoaktivite Analizleri.....	57
3.4.1. ACE Önleyici Aktivite Testi .....	57
3.4.2. DPP-IV Önleyici Aktivite Testi.....	58
3.5. Model Ürün Denemeleri .....	59
3.5.1. Model Gıda Üretimi ve Depolama Koşulları.....	60
3.5.2. Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması.....	63
3.6. İstatistiksel Analiz.....	66
3.7. Ürünlerin Simüle Edilmiş ( <i>In Vitro</i> ) Sindirimi .....	67
3.7.1. Sindirim Protokolü Uygulanmış Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması .....	71
<b>DÖRDÜNCÜ BÖLÜM .....</b>	<b>72</b>
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>72</b>
4.1. Proteinlerin Eldesi ve Proteolitik Muameleler .....	72
4.1.1. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Eldesi .....	72
4.1.2. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Hidrolizi.....	72

4.1.3. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Numunelerinin %Nem, %Protein ve Kül Tayini .....	73
4.1.4. Kjeldahl Analizleri.....	73
4.1.5. TNBS Yöntemi ile Hidroliz Derecesinin (%DH) Belirlenmesi.....	74
4.2. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Hidrolizatlarının Biyoaktivite Analizleri .....	76
4.3 Model Gıda Ürünlerine Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması.....	77
4.3.1. ACE Önleyici Aktivite Testi .....	77
4.3.2. DPP-IV Önleyici Aktivite Testi.....	97
4.4. Sindirim Protokolü Uygulanmış Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması .....	98
4.5. Ürünlere LC-MS/MS Analizlerinin Yapılması.....	100
<b>SONUÇ</b> .....	<b>111</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>114</b>
<b>KAYNAKÇA</b> .....	<b>116</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>135</b>

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Ayçekirdeği örneklerinin besin kompozisyonu .....	73
Tablo 4.2: Örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesi .....	74
Tablo 4.3: Hidroliz derecesi (%DH) belirlenmesi .....	75
Tablo 4.4: Hidrolizat ve fraksiyonların hidroliz derecesi .....	76
Tablo 4.5: Protein hidrolizatlarının biyoaktivite analizleri .....	77
Tablo 4.6: İlk gün ürünlere biyoaktivite testlerinin uygulanması .....	79
Tablo 4.7: Depolamalanmış vegan köfte ürünlerinin ACE- önleyici aktivitesi (%)....	81
Tablo 4.8: ANOVA ve Tukey Testi- vegan köfte grupları %ACE inhibe edici değerleri .....	83
Tablo 4.9: t-Test- vegan köfte grupları %ACE inhibe edici değerleri.....	84
Tablo 4.10: Depolamalanmış ekmek ürünlerinin ACE- önleyici aktivitesi (%).....	86
Tablo 4.11: ANOVA ve Tukey Testi- ekmek grupları %ACE inhibe edici değerleri .....	88
Tablo 4.12: t-Test- ekmek grupları %ACE inhibe edici değerleri.....	89
Tablo 4.13: Depolamalanmış yoğurt ürünlerinin ACE- önleyici aktivitesi (%).....	92
Tablo 4.14: ANOVA ve Tukey Testi- yoğurt grupları %ACE inhibe edici değerleri .....	94
Tablo 4.15: t-Test- vegan köfte grupları %ACE inhibe edici değerleri.....	95
Tablo 4.16: Depolamalanmış yoğurt ürünlerinin DPP-IV önleyici aktivitesi (%).....	97
Tablo 4.17: Sindirim protokolü uygulanmış model kontrol, APH, KPH ve BPH içeren (%5) ekmek, vegan köfte ve yoğurt değerleri ACE- önleyici aktivite (%) .....	99
Tablo 4.18: Üretim günü %5KPH- %5BPH içeren yoğurt örneklerinin LC-MS/MS analiz sonuçları .....	108
Tablo 4.19: %5 KPH ve BPH yoğurt örneklerinin %ACE inhibitör etkinliği.....	109
Tablo 4.20: %5 KPH ve BPH yoğurt örneklerinin %DPP-IV inhibitör etkinliği ....	110

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: Yağı alınmış ayçiçeği posası.....	36
Şekil 3.2: Konsantre peynir altı suyu .....	37
Şekil 3.3: Ultrafiltrasyon (UF) arıtma ve membran sistemleri .....	38
Şekil 3.4: Kjeldahl azot protein tayini distilasyon cihazı.....	39
Şekil 3.5: Laboratuvar tipi distilasyon cihazı.....	40
Şekil 3.6: HPLC (high performance liquid chromatography) yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı.....	41
Şekil 3.7: Infrared yakma sistemi ile toplam azot miktarının belirlenmesi .....	42
Şekil 3.8: Protein izolatlarının liyofilizasyonu.....	43
Şekil 3.9: Numunelerin santrifüjlenmesi.....	44
Şekil 3.10: Spektrofotometre cihazı.....	45
Şekil 3.11: Yüksek devirli karıştırıcı kullanımı .....	46
Şekil 3.12: Ultrasonic banyo vasıtası ile mobil faz içerisinde biriken gazların uzaklaştırılması.....	47
Şekil 3.13: Hassas terazi .....	48
Şekil 3.14: pH metre cihazı.....	48
Şekil 3.15: Ayçiçeği çekirdeği protein izolasyonu .....	51
Şekil 3.16: Liyofilize edilmiş ayçiçeği protein izolatı .....	52
Şekil 3.17: Peynir altı suyu numunelerinin ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantrasyonu .....	52
Şekil 3.18: Beyaz, kaşar peynir altı suyu, ayçiçeği hidrolizat örnekleri .....	54
Şekil 3.19: Protein hidrolizatlarının hidroliz derecesinin belirlenmesi.....	55
Şekil 3.20: Ayçiçeği hidrolizatlarının ultrafiltrasyon ile fraksiyonlanması.....	56
Şekil 3.21: Ultrafiltrasyon membranları .....	57
Şekil 3.22: Ekmek ve yoğurt yapma makinesi.....	60
Şekil 3.23: Hidrolizat içeren ve içermeyen ekmek örnekleri.....	61

Şekil 3.24: Ayçiçeği protein hidrolizatı (APH) içeren yoğurt örneği .....	62
Şekil 3.25: Ticari vegan köfte karışımı ve nihai ürünü .....	63
Şekil 3.26: Kontrol APH (%2-5) içeren ekmek örnekleri .....	64
Şekil 3.27: Kontrol %2 BPH ve %5 KPH içeren yoğurt örnekleri .....	64
Şekil 3.28: Kontrol %2 ve %5 APH içeren vegan köfte örnekleri .....	65
Şekil 3.29: Hazırlanan örneklerin HPLC cihazına verilmesi .....	66
Şekil 3.30: Üretim günü kontrol, APH, KPH ve BPH (%2-5) hidrolizat içeren yoğurt örnekleri .....	68
Şekil 3.31: Üretim günü kontrol, APH, KPH ve BPH (%2-5) hidrolizat içeren ekmek örnekleri .....	68
Şekil 3.32: Sindirim ve santrifüj sonrası vegan köfte örnekleri .....	69
Şekil 3.33: Sindirim ve santrifüj sonrası ekmek örnekleri .....	69
Şekil 3.34: Sindirim ve santrifüj sonrası vegan köfte örnekleri .....	70
Şekil 3.35: Sindirim ve santrifüj sonrası yoğurt örnekleri .....	70
Şekil 3.36: Sindirim sonrası ilk gün kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH hidrolizat içeren ekmek, yoğurt ve vegan köfte örnekleri .....	71
Şekil 4.1: APH, KPH ve BPH protein hidrolizatlarının TNBS yöntemi ile (%DH) analizi .....	75
Şekil 4.2: Yoğurt ürünlerinin %DPP-IV inhibisyon grafiği .....	98
Şekil 4.3: Kontrol grubu yoğurt örneklerinin LC-MS/MS veri analizi .....	102
Şekil 4.4: %5 APH içeren yoğurt örneklerinin LC-MS/MS veri analizi .....	103
Şekil 4.5: %5 BPH içeren yoğurt örneklerinin LC-MS/MS veri analizi .....	104
Şekil 4.6: %5 KPH içeren yoğurt örneklerinin LC-MS/MS veri analizi .....	105

## KISALTMALAR

g	: Gram
dk	: Dakika
kg	: Kilogram
l	: Litre
m	: Mili
Da	: Dalton
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
$\mu$	: Mikro
N	: Normal
mmol	: Milimolar
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen gücü
DH	: Degree of hydrolysis (hidroliz derecesi)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
HHL	:Hippüril-Histidil-Lösün
HA	:Hippürik Asit
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
DPP-IV	: 2,2- Dipeptidil peptidaz-IV
PNA	: Gly- Pro-pNA
ABS	: Absorbans
UF	: Ultrafiltrasyon

UV	: Ultraviyole
HPLC	: High performance liquid chromatography (yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
PH	: Pepsin enzimi ile hazırlanan hidrolizat
SGF	: Simüle edilmiş mide sıvısı
vd.	: ve diğerleri
vb.	: ve benzeri
P	: Proses
D	: Depolama
S	: Sindirim
R	: Referans, 0. Gün
AH	: Alkalaz enzimi ile hazırlanan hidrolizat
AÇ	: Ayçekirdeği
KP	: Kaşar peynir altı suyu
BP	: Beyaz peynir altı suyu
VK	: Vegan köfte
YO	: Yoğurt
EK	: Ekmek
VK-APH-S	: Ayçekirdeği hidrolizatı içeren sindirim uygulanmış vegan köfte
VK-APH-D	: Ayçekirdeği hidrolizatı için depolanmış vegan köfte
VK-APH-P	: Ayçekirdeği hidrolizatı için proses edilmiş vegan köfte
API	: Ayçiçeği protein izolatı
APH	: Ayçiçeği protein hidrolizi
KPH	: Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizi

BPH : Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizi

AKP : Ayçiçeği küspe proteini

h : Saat

DSÖ : Dünya sağlık rgt

GT : Gıda ve tarım rgt

BM : Birleşmiş milletler

KK : Köpük oluşturma kapasitesi

KS : Köpük stabilitesi

KPAS : Kaşar peynir altı suyu

BPAS : Beyaz peynir altı suyu

# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar ülkemizde ve dünyada ölüm olaylarının başlıca nedenlerinden biridir (Çağlar, 2019). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, her yıl yaklaşık 17,9 milyon kişinin kardiyovasküler hastalıklardan dolayı hayatını kaybettiği belirtilmektedir (Göksu vd., 2022).

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan risk faktörlerinden biridir (Göksu vd., 2022). Hipertansiyon, dinlenme durumunda arteriyel sistolik ve/veya diyastolik kan basıncının yükselmesi ( $\geq$  140/90 mm Hg) olarak tanımlanır. Günümüzde hipertansif hastalıklar insan sağlığını ciddi anlamda tehdit etmektedir. Hipertansiyonun dünya çapında ortalama yaygınlığı %15 civarındadır (Li ve Yu, 2015).

Tip 2 diyabet (T2D), dünyada 347 milyondan fazla kişiyi olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda iki ana diyabet türünün %90'ını oluşturan ve çeşitli rahatsızlıklara da sebebiyet veren bir sağlık sorunudur (Amaya-Farfan vd., 2016).

Dolaşım sistemi hastalıklarının risk faktörleri arasında hipertansiyon ve diyabet tedavisinde kullanılan ACE ve DPP-IV inhibitörleri önemli bir yer tutmaktadır (Çağlar, 2019).

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE), membrana bağlı bir çinko metalloproteazıdır ve glikozidik bağlar içerir. ACE, kan basıncını, su ve tuz dengesini belirleyen renin-anjiyotensin sisteminde kritik bir role sahiptir. Bu enzim, anjiyotensin I hormonunu, bir damar daraltıcı (vazokonstriktör) bir hormon olan anjiyotensin II hormonuna dönüştürür ve ayrıca; damar genişletici (vazodilatör) bir peptid olan bradikininini de hidroliz ederek yıkar, böylece peptidin damar genişletici fonksiyonunu engeller. Bu şekilde, ACE, tansiyonu yükseltir ve kandaki sıvı ve tuz dengesini ayarlar (Çağlar, 2019). Bu iki etki nedeniyle, ACE, insanlarda kan basıncını artırma potansiyeline sahiptir (Coşkun vd., 2019); (Gülseren, Çakır, 2019).

Hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların klinik tedavisinde sentetik anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri de dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu sentetik ilaçlar ishal, alerji,

deri döküntüleri, böbrek fonksiyon bozukluğu ve bazen de hipotansiyon gibi çeşitli yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu yüzden doğal ve güvenli ACE inhibitörlerinin araştırılması kritik bir araştırma alanıdır (Göksu vd., 2022). ACE-inhibitör peptitler, sentetik ilaç moleküllerinin belirgin yan etkilerini göstermeden kan basıncını düzenleme ve hipertansiyon potansiyelini azaltma yeteneğine sahiptir (Coşkun vd., 2019); (Gülseren, Çakır, 2019).

Farklı gıda matrislerine protein hidrolizatları eklenince ortaya çıkan biyoaktivite çalışmaları özellikle de endüstriyel işleme ve depolama koşulları ile ilgili koşullar da sınırlıdır (Harnedy-Rothwell vd., 2021).

Atık ürünün değerlendirilmesi, döngüsel ekonominin bir parçası olarak üretim zincirlerine dahil edilebilecek ürünler yaratmak amacıyla atığı fiziksel, termal, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle dönüştüren bir süreç olarak tanımlanabilir (León-López vd., 2022).

Protein talebi artışı sürdürülebilir bir arz gerektirir (Coşkun vd., 2019). Yağlı tohumlar ve yağlı meyvelerdeki protein içeriği nispeten yüksek olduğundan ve proteinler yağın uzaklaştırılma sürecinde yoğunlaştığından, protein üretimi için makul derecede ekonomik ve sürdürülebilir alternatif birer kaynak oluşturdukları söylenebilir (Gülseren ve Çakır, 2019).

Bunun bir örneği, ayçiçeği gibi yağlı tohumlu bitkilerden elde edilen yağı alınmış unlardan protein izolatlarının ve hidrolizatlarının üretilmesidir. Son zamanlarda protein hidrolizatları da biyoaktif peptitlerin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bunlar, gastrointestinal sindirim sırasında veya öncesinde *in vitro* protein hidrolizi sırasında salınan ve yararlı biyolojik aktiviteye sahip olan gıda proteinlerindeki küçük amino asit dizileridir (Megías, Pedroche, Del Mar Yust, vd., 2009). İnsan beslenmesinde nispeten az tüketilen ayçiçeği çekirdeği, alternatif bitkisel protein kaynaklarının değerlendirilmesinde, yaklaşık %20 protein içermesi sebebiyle umut verici bir aday olabilir (Tessier vd., 2020).

Önceki yıllarda peynir altı suyu yüksek kapasitede oluşumu nedeniyle ülkemizde ve dünyada çevre için ciddi bir sorun oluşturuyordu. Membran proseslerindeki ilerlemeler peynir altı suyu bileşenlerinin yüksek kalitede izolasyonuna ve fraksiyonlanmasına imkân vermiştir (Ramos vd., 2016). Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında çökeltme ve pıhtının uzaklaştırılmasından arta kalan sıvıdır. Peynir

altı suyu, çoğunluğu (%90-94) sudan oluşan, aynı zamanda yüksek ve çeşitli organik içeriğe sahip, bulanık sarımsı bir sıvıdır (Ramos vd., 2016). Peynir altı sularının besin değeri yüksek ve sindirimi yardımcıdır. Toplam proteinin yaklaşık %20'sini oluşturur (Amaya-Farfan vd., 2016).

Hem hayvanlar hem de insanlar üzerinde yapılan çalışmalar, peynir altı suyu tüketiminin hem insülin üretimini azaltan hem de insülin duyarlılığını iyileştiren mekanizmalar aracılığıyla kan şekeri seviyelerini düşürmeye yardımcı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak hidroliz edilmemiş (veya parçalanmamış) peynir altı sularının tamamının tip 2 diyabet hastalarında sağlıklı yaşam tarzını destekleyici etkiye sahip olduğu, ancak hidrolizatın insanlarda henüz denenmediği bildirilmiştir (Amaya-Farfan vd., 2016).

Mevcut çalışmada çevresel ve ekonomik açıdan fayda sağlayacak bu iki hammaddeden istifade edilmiştir. Protein hidrolizatlarının fonksiyonel gıda bileşenleri olarak kullanılabilmesi için, gıda üretim, depolama ve sindirim süreçlerinde aktivitelerini korumaları gerekmektedir. (Harnedy-Rothwell vd., 2021) Bu nedenle, bu çalışma üç ayrı saklama koşulunda (25°C ekmek, +4°C yoğurt ve -20°C vegan köfte) muhafaza edilen bitkisel ve hayvansal (ayçiçeği çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu) protein hidrolizatlarını içeren toplam 21 farklı ürünün biyoaktif özelliklerinin *in vitro* olarak incelenmesine dayamaktadır.

Çalışma önceliklerinden biri, çeşitli ekonomik bitkisel ve hayvansal protein ürünleri üretmek amacıyla soğuk pres ve peynir üretimi yan ürünlerinin (ayçiçek küspesi ile kaşar ve beyaz peynir altı suyu numunelerinin) değerlendirilmesi, hidrolizi ile yeni ürünlerinin geliştirmesine dayanır. (Gülseren ve Çakır, 2019)

Dolayısıyla bu çalışmanın amacı ayçiçeği posası ve peynir altı suyundan proteoliz, fraksiyonlama ve uygun *in vitro* teknikler kullanılarak antihipertansif, antidiyabetik ve antioksidatif peptitler tanımlamak ve bunların çeşitli özelliklerini (fizikokimyasal ve biyoaktif açıdan) belirlemektir. (Çağlar, 2019). Çalışmada peptitlerin tanımlanması açısından önemli uygun LC-MS/MS vb. tekniklerden yararlanılmıştır.

Bu çalışma bitkisel ve hayvansal gıda üretimi yan ürünleri kullanılarak uygun tekniklerle protein ürünleri üretilmesi, bu ürünlerin enzimatik yöntemlerle proteolize uğratılması ve böylelikle elde edilen protein hidrolizatlarının membran teknikleri ile (ultrafiltrasyon, UF) fraksiyonlanması, UF fraksiyonlarının biyoaktif özelliklerinin

değerlendirilmesi, biyoaktif olduğu gösterilen fraksiyonların uygun LC-MS/MS ve de novo sekanslama teknikleri ile incelenmesi, her aktivite kategorisinde başarı gösteren fraksiyonların 3 farklı model gıdada kullanımı ile proses, depolama ve sindirim süreçlerinin peptit yapı ve biyoaktivitesine etkisi incelenmektedir.

Soğuk pres yağ üretiminden artakalan bitkisel posalardan enzimatik proteoliz ile protein hidrolizatları üretilir ve uygun fraksiyonlama yöntemleriyle ayrıştırılır. Bu fraksiyonlarda bulunan peptitlerin yapıları aydınlatılır. Örneğin, ayçiçeği peptit fraksiyonları, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibe edici etkileri açısından *in vitro* yöntemlerle test edilir. Bu çalışmaların amacı bitkisel kökenli, toksik özellikleri olmayan ve gıda, gıda takviyelerinde kullanıma uygun biyoaktif peptit fraksiyonları üretmektir ve bu peptitlerin antidiyabetik ve antihipertansif etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, *in vitro* biyoaktivite gösteren bu peptit fraksiyonlarının model fonksiyonel gıda ürünlerinin üretim, depolama ve sindirim süreçlerine kararlılığı da incelenerek uygun fraksiyonlama teknikleri ile bu peptitlerin ayrılması, konsantre edilmesi veya saflaştırılmasında bir engel görülmemiştir.

Bu çalışmada ayçiçeği çekirdeği bitkisel protein hidrolizatlarının yanı sıra hayvansal numuneler de kullanılmış ve benzer amaçlarla değerlendirilmiştir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### LİTERATÜR TARAMASI

#### 2.1. Proteinler

Proteinler, gastrointestinal sindirim sırasında çok çeşitli peptitlere hidrolize olabilen gıdalardaki önemli besinlerdir. Bu peptitlerin bazıları organizmada hormonlar, nörotransmitterler veya düzenleyici peptitler olarak etki eden özellikleri paylaşmaktadır (León-López vd., 2022).

Proteinler, ayırt edici fonksiyonel özellikleri sayesinde gıda sistemlerinin yapılandırılmasında ve stabilizasyonunda önemli bir rol oynarlar. Proteinlerin emülsifikasyon, köpük oluşturma, jel ve film oluşturma yetenekleri kritik öneme sahiptir ve gıda maddesinin doku, stabilite, tüketici kabulü ve raf ömrü gibi bazı kalite kriterlerinden sorumludur. Proteinlerin işlevselliği, yapılarından, amino asit bileşimlerinden, net yüklerinden, oranından, hidrofobik ve hidrofilik bileşiklerin yapı içindeki dağılımından ve ayrıca pH, iyon gücü vb. fiziksel faktörlerden etkilenir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Yağlı tohumların işlenmesi sırasında, küresel olarak yağlı tohum küspeleri gibi önemli miktarda yan ürünler meydana gelmektedir. Örneğin, 2002 yılında Avrupa Komisyonu'nun resmi verilerine göre, AB'de çoğunlukla soya fasulyesi (yaklaşık %50), kolza tohumu (yaklaşık %33) ve ayçiçeği tohumu (yaklaşık %18) dahil olmak üzere 30-35 milyon ton yağlı tohum işlenmiştir. Bazı yem veya gübre uygulamalarında küspelerin kullanılması pratik olsa da bu ürünler çoğunlukla düşük ticari değere sahiptir. Ayrıca kurutmadan önce mikrobiyal bozunma da önemli bir sorun teşkil etmektedir. Büyük hacimleri işlemeyi, taşımayı ve kullanmayı oldukça zorlaştırır. Bu nedenle, gerek ekonomik açıdan olsun gerekse besinsel ve çevresel faktörlere fayda sağlaması açısından katma değerli ürünlere ihtiyaç vardır (Coşkun ve Gülseren, 2020).

Yağlı tohumlar çoğu durumda önemli miktarlarda %17-47 yağ içerirken, yağ geri kazanımının büyüklüğü, soğuk pres teknolojileri ve solvent ekstraksiyonu gibi yağ üretim tekniklerine bağlıdır (Coşkun ve Gülseren, 2020).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, onların gıda sistemlerinde fonksiyonel araçlar olarak kullanılmasını teşvik eder. Köpüklenme, emülsifikasyon veya jelleşme gibi özellikler birçok endüstriyel gıda ürününün üretiminde çok önemlidir. Yumurta akı, süt proteinleri veya jelatin gibi hayvansal bazlı proteinler, yüksek fonksiyonellik kapasiteleri nedeniyle ağırlıklı olarak kullanılırken, hayvansal bazlı proteinlerin alternatifi olan fonksiyonel bitki bazlı proteinlere olan ilgi de giderek artmaktadır (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Bir proteinin çözünürlüğü işlevselliğinin birincil ön koşuludur, çözünmeyen proteinler ise buna katkıda bulunamaz. Protein-su etkileşimi ve su tutma kapasitesi, yüklü grupların miktarına, konfigürasyona, pH'sına, iyonik kuvvete ve konsantrasyona göre değişir. Bir proteinin hidrofiliği, protein yapısındaki amino asitlerin hidrofilik/hidrofobiklik oranının ne kadar yüksek olduğuna bağlıdır. Bu oran, dış uygulamalara veya fiziksel koşullara bağlı olarak artabilir veya azalabilir ve oranın artması, protein çözünürlüğünün artması anlamına gelir. Öte yandan, daha yüksek çözünürlük viskoziteyi artırır, daha iyi köpürmeyi, daha yüksek emülsifikasyonu ve jelleşme kapasitelerini sağlar (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Suda çözünen proteinler (albüminler), tuzda çözünen proteinlerden (globülin) daha iyi bir çözünürlüğe sahiptir (Gültekin Subaşı vd., 2022)

Proteinlerin jel oluşumu, bazı gıda ürünlerinin aynı zamanda önemli kalite parametreleri olan yapısal ve reolojik özelliklerini de oluşturur. Proteinler, üç boyutlu moleküller arası etkileşim ağları yoluyla jel oluşumu sergilerler (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Proteinler, çözünürlük, bağlanma, köpürme, emülsifiye etme ve jelleşme gibi çeşitli fonksiyonel özelliklerinden dolayı görünüşlerini, dokularını ve ağız hissini iyileştirme yeteneklerinden dolayı işlenmiş gıdalarda bileşen olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu fonksiyonel özellikler, protein moleküllerinin yapısında ve etkileşiminde değişikliklere neden olabilen pH, iyon gücü, sıcaklık ve enzim aktivitesinden güçlü bir şekilde etkilenir. Bu nedenle, fonksiyonel performanslarını etkilediği için ekstraksiyon ve saflaştırma sırasında protein özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri dikkate almak çok önemlidir. Farklı proteinlerin fonksiyonel yeteneklerini anlamak, spesifik uygulamalar için en uygun protein bazlı bileşenin seçilmesi açısından önemlidir (Hadidi vd., 2024).

### 2.1.1. Amino Asitler ve Peptitler

Biyoaktif peptitler, daha büyük bir proteinin amino asit dizisinde şifrelenebilir. Bu peptitler genellikle 3-20 amino asitten oluşur ve bozunma sonrasında orijinal proteinden salınır.

Şifrelenmiş peptitlerin serbest bırakılmasının üç yolu vardır bunlar sırası ile; tripsin gibi sindirim enzimleri tarafından sindirim sırasında gerçekleşen *in vivo* sindirim, mikrobiyal enzimler tarafından sindirim sırasında gerçekleşen *in vivo* sindirim ve izole edilmiş veya mikrobiyal enzimler (örneğin *Lactobacillus helveticus* tarafından) yoluyla gıda işleme veya olgunlaşma sırasında gerçekleşen *in vitro* sindirimdir (Möller vd., 2008).

Opiat, antitrombotik, antihipertansif, immünomodülatör, antilipemik, osteoprotektif, antioksidatif, antimikrobiyal, ileum büzücü, antikaryojenik ve büyümeyi teşvik edici özellikler dahil olmak üzere enzimatik proteoliz yoluyla diyet proteinlerinden salınan peptitler için çok sayıda biyoaktivite tarif edilmiştir. Spesifik peptitler bir veya daha fazla farklı biyolojik etkiye sahip olabilir (Möller vd., 2008).

### 2.1.2. Alternatif Protein Kaynağı Olarak Yağlı Tohumlar

Küresel olarak protein talebi arttıkça, uygun fiyatlı ve yüksek kaliteli protein ürünleri oldukça rağbet görmüştür (Gülseren ve Çakır, 2019). Bu durum hayvansal protein kaynaklarının yanı sıra bitkisel protein kaynaklarına olan talebin de artmasına yol açmıştır (Tessier vd., 2020). Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler süt, yumurta, et ve çeşitli balık türleri ile birçok bitkide bulunmaktadır (Y. Li ve Yu, 2015).

Bitki tohumları, potansiyel olarak insanların refahını artıracak proteinler de dahil olmak üzere önemli bir besin kaynağı olarak hizmet eder. Tohumlar, biyolojik bileşik içeriklerinin yanı sıra birçok farmakolojik bileşen veya ilacın öncülleri için de potansiyel kaynak görevi görür (Çakır ve Gülseren, 2019).

Protein talebinin sürekli artışı sürdürülebilir bir arz gerektirir (Coşkun vd., 2019). Yağlı tohumlar protein içeriği nispeten yüksek olduğundan ve proteinler yağdan arındırma sırasında daha da yoğunlaştığından, protein üretimi için makul derecede ekonomik ve sürdürülebilir alternatif bir kaynaktır (Gülseren ve Çakır, 2019).

Yağlı tohumlardan yağ ekstraksiyonunun yan ürünü olan yağlı tohum küspeleri, protein içeriği yaklaşık %15 ila 50 arasında değişen değerli bir protein kaynağıdır. Soya fasulyesi, kolza tohumu, pamuk tohumu, ayçiçeği tohumu ve yer fıstığı gibi başlıca yağlı bitkiler büyük miktarlarda proteinli besinler üretir. Bu yağlı tohumlu bitkiler öncelikle yenilebilir yağ kaynağı olarak kullanılmakta ve küresel üretimin 2022/2023'te yaklaşık 636 milyon MT olacağı tahmin edilmektedir. Besin açasından zengin olmasına rağmen yağlı tohum kalıntıları genellikle atılır veya evcil hayvanlar için yem olarak kullanılır. Bununla birlikte, insan tüketimi için uygun maliyetli ve bol miktarda protein kaynağı olarak hizmet etme potansiyeline sahiptirler. Ayçiçeği küspesi proteini (AKP) , yaygın bulunabilirliği, yüksek protein içeriği ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle en umut verici yağlı tohum proteinlerinden biridir (Tessier vd., 2020).

## 2.2. Ayçiçeği

Ayçiçeği protein izolatının (API) fonksiyonel özellikleri son yıllarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve sonuçlara genel bir bakış, API'nin karmaşık gıda sistemlerinin yapı gelişimi ve stabilizasyonu için alternatif bir protein kaynağı olarak umut verici olduğunu göstermektedir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Ayçiçeği gibi yağlı tohumlu bitkilerden elde edilen yağı alınmış unlardan protein izolatları ve hidrolizatları üretilebilmektedir. Son zamanlarda protein hidrolizatları da biyoaktif peptitlerin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bunlar, gastrointestinal sindirim sırasında veya öncesinde *in vitro* protein hidrolizi sırasında salınan ve yararlı biyolojik aktiviteye sahip olan gıda proteinlerindeki küçük amino asit dizileridir (Megías, Pedroche, Del Mar Yust, vd., 2009). İnsan beslenmesinde nispeten az tüketilen ayçiçeği çekirdeği, alternatif bitkisel protein kaynaklarının değerlendirilmesinde, yaklaşık %20 protein içermesi sebebiyle umut verici bir aday olabilir (Tessier vd., 2020).

Ayçiçek yağı ekstraksiyonundan sonra yağı alınmış kek/küspe veya pres keki olarak bilinen değerli bir yan ürün elde edilir. Kek, yüksek protein ve lif içeriğinin yanı sıra biyoyakıt üretiminde de değerli bir hayvan yemi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek protein içeriği, yağı alınmış ayçiçeği kekini umut verici ve ucuz bir protein kaynağı haline getirmektedir. Endüstriyel atık/yan

ürünün yeniden değerlendirilmesi, sürdürülebilir bitki bazlı protein üretimi yaklaşımı açısından da önemlidir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Bazı işleme koşulları kek bileşimini etkileyebilir. Yağ işlemeden önce tohumların kabuğunun çıkarılması bunlardan biridir ve tam tohum, kısmen kabuğu çıkarılmış tohum veya tamamen kabuğu çıkarılmış çekirdek kullanılarak farklı bileşimlere sahip pres kekleri elde edilmiştir. Yağdan arındırma işlemi, soğuk pres, sıcak pres ve/veya solvent ekstraksiyonu olarak gerçekleştirilen kek bileşimini etkileyen bir diğer adımdır (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Ayçiçeği tohumları yaklaşık %20 ham protein içerir (Gültekin Subaşı vd., 2022). Bu miktar mekanik ekstraksiyon sonrasında küspede yaklaşık %40'a, yağın organik çözücülerle uzaklaştırılmasından sonra ise yaklaşık %50'ye çıkar (Tessier vd., 2020). Yağlı tohum proteinlerinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması, konsantreler (%48-70 protein) elde etmek için biyokütlenin nötr veya asidik ortamda veya izolatlar (%85-90 protein) elde etmek için alkali ortamda işlenmesiyle gerçekleştirilebilir. Protein konsantreleri, protein içermeyen bileşiklerin, özellikle çözünebilir minerallerin, karbonhidratların, düşük molekül ağırlıklı nitrojen bileşiklerinin ve besleyici olmayan faktörlerin biyokütleden uzaklaştırılmasıyla elde edilir. İşlemin türü, elde edilen konsantrelerin kalitesini ve miktarını etkiler. Ayçiçeği yağlı tohum biyokütlesi göz önüne alındığında, protein ekstrakte edilebilirliği ayçiçeği kekinin bileşimi ile ilişkilidir ve AP'nin baskın globulin içeriği (11S), protein ekstraksiyonunu zorlaştırır ve ekstraksiyon verimini azaltır (Gültekin Subaşı vd., 2022).

### **2.2.1. Dünya Ayçiçeği Pazarı ve Türkiye'deki Durumun İncelenmesi**

Ayçiçeği, dünyada yetiştirilen en önemli yağlı tohumlu bitkilerden biri olup, yağ üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır. Başlıca üretici ülkeler Rusya, Arjantin, Fransa, ABD, Çin ve İspanya'dır (Villanueva vd., 1999). Dünya çapında ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tohumu üretiminin 2022/2023 döneminde 50 milyon tonun üzerinde olacağı tahmin edilmektedir. Ayçiçeği tohumları, tipik olarak %30 ile %50 arasında değişen nispeten yüksek miktarda protein içerir. Kabuk ayırma ve yağ çıkarma işleminin etkinliğine bağlı olarak küspedeki protein içeriği %66'ya kadar çıkabilen (Villanueva vd., 1999) bu ürün insanlar için optimal bir protein kaynağı oluşturabilir (Villanueva vd., 1999). Ayrıca, Ayçiçeği Küspe Proteinini AKP'ler iyi

dengelenmiş bir amino asit profiline sahiptir ve emülsifiye etme, köpürtme, jelleştirme ve bağlama özellikleri gibi iyi tekno-fonksiyonel özellikler sergileyebilir (Hadidi vd., 2024).

### **2.2.2. Ayçiçeği Protein İzolatı**

İzoelektrik çökeltme, yalnızca ayçiçeğinden değil aynı zamanda diğer bitki bazlı kaynaklarında da (Karaca, Low ve Nickerson) en yaygın kullanılan protein izolasyon yöntemidir. Prosedür iki temel adımdan oluşmaktadır. Öncelikle pH'ı proteinlerin tamamen çözündüğü varsayılan noktanın üzerine çıkarmak (yaklaşık pH 10) ve ardından pH'ı proteinlerin çökeldiği varsayılan, protein izoelektrik noktasının altına düşürmek (yaklaşık pH 4.5). Protein izolatlarının üretilmesi için iyon değiştirme kromatografisi veya HPLC, ultrafiltrasyon ve diyaliz (membran teknolojileri) ile birleştirilmiş izoelektrik çökeltme uygun uygulamalardır (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Spesifik olarak, bazı fiziksel işleme yöntemleriyle veya daha yüksek verimlilik için NaCl ilavesiyle birleştirilmiş izoelektrik çökeltmenin, uygun, düşük maliyetli olduğu görülmektedir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

### **2.2.3. Ayçiçeği Protein Hidrolizatlarının Hazırlanması**

Enzimler bir proteinin yapısını ve bunun sonucunda da fizikokimyasal ve işlevsel özelliklerini değiştirir. Ayrıca, sınırlandırılmış enzim hidrolizinin, besin değerini düşürmeden gıda proteinlerinin işlevselliğini iyileştirmenin iyi bir yolu olduğu belirtilmiştir. Önceki çalışmalar, organik proteinlerin proteolitik bozunmasının hidrolizatın işlevselliğini etkileyebileceğini göstermiştir. Sınırlı enzimatik hidroliz, proteinlerin moleküler boyutunu, yapısını ve moleküller arası ve molekül içi etkileşim kuvvetlerini değiştirerek işlevsel niteliklerini iyileştirebilir. Ayrıca, protein hidrolizatlarındaki küçük peptitler bağırsaktan serbest amino asitlerden veya bozulmamış proteinlerden daha hızlı emilir (Rout vd., 2024). Bu bağlamda ilgili çalışmada sunulan, gıda yan ürünlerinin bir çıktısı olan AKP'lerin hidrolizat olarak kullanılmasının makul olacağı sonucuna varılmıştır.

Endüstriyel yağ ekstraksiyonu sırasında ayçiçeği proteinleri kısmen denatüre olur, dolayısıyla çözünürlükleri azalır. Çözünürlüğü arttırmak için proteinler hidrolize edilerek sıvı gıdaların zenginleştirilmesinde gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir. Yüksek kalitede üretilen Ayçiçeği Protein İzolatı (API) ile bir endo-proteaz (Alkalaz) ve ekso-proteaz (Flavorzim) kullanılarak farklı katalitik aktivitelere sahip, doğrudan kullanılacak yüksek kalitede kapsamlı ayçiçeği protein hidrolizatı üretilmektedir (Villanueva vd., 1999). Bu enzimler, proteinlerin parçalanmasında oldukça etkilidir ve bu da hidroliz sürecini daha verimli hale getirir. Alkalaz ve Flavorzim, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil çalışabildikleri için hidroliz süreci kontrollü ve verimlidir. Bu enzimlerin, istenen tat ve fonksiyonel özelliklere sahip peptitlerin elde edilmesinde başarı olduğu gözlenmiş, ayrıca ekonomik ve pratiklik açısından da uygun bulunmuştur (Park vd., 2023). Bu nedenle ilgili çalışmada enzim olarak Alkalaz ve Flavorzim tercih edilmiştir.

#### **2.2.4. Ayçiçeği Proteinleri Eldesi**

Ayçiçeği yağsız küspesi insan beslenmesi için yararlı olabilecek yaklaşık %30 protein içerir ve yağsız küspe kullanılarak ayçiçeği protein izolatlarının üretimi, bu tarımsal yan ürünün değerini artırmanın bir yolu olarak tanımlanmıştır. Bu protein izolatları, iyileştirilmiş işlevsel ve besinsel özelliklere sahip protein hidrolizatları üretmek için hidrolitik işlemlere tabi tutulabilir (Megías, Pedroche, Yust, vd., 2009). Ayçiçeği proteinlerinin saflaştırılmasında genel olarak izlenen adımlar sırasıyla; ekstraksiyon, çöktürme, diyaliz, kromatografi ve saflaştırma kontrolüdür.

#### **2.2.5. Ayçiçeği Proteinlerinin Teknik ve Fonksiyonel Özellikleri**

Diyetten alınması gereken esansiyel amino asitler arasında lösin (Leu), izolösin (Ile), valin (Val), lizin (Lys), treonin (Thr), triptofan (Trp), metiyonin (Met), fenilalanin (Phe) ve histidin (His) bulunur. Tahıllarda ve yağlı tohumlarda, lizin ve metiyonin tipik olarak sınırlayıcı amino asitlerdir ve dolayısıyla besin kalitelerini düşürürler. Ancak diğer yağlı tohumlarla (soya, kolza tohumu ve kanola gibi) karşılaştırıldığında ayçiçeğinin daha yüksek seviyelerde lizin ve metiyonin içerdiği rapor edilmiştir. Aslında AKP'lerin amino asit bileşimi, lizin hariç tüm temel amino asitler için Dünya

Sağlık Örgütü (DSÖ)/ Gıda ve Tarım Örgütü (GTÖ)/Birleşmiş milletler (BM) kriterlerini karşılamaktadır (Hadidi vd., 2024).

Ayçiçeği tohumları iki ana protein türü içerir: suda çözünebilir albuminler (ayrıca ayçiçeği albuminleri veya 2S olarak da bilinir) ve tuzda çözünebilir globulinler (aynı zamanda heliantinin veya 11S olarak da bilinir). Bu proteinler yaklaşık 2:1 11S-2S oranında mevcuttur; bu, ayçiçeği tohumlarının yaklaşık %60-80 heliantinin ve %25-30 ayçiçeği albumini içerdiği anlamına gelir. Ayçiçeği albuminlerinin çözünürlüğü ve moleküler ağırlığı, iyonik güç ve pH'taki değişikliklerden etkilenmez. Ayçiçeği albuminleri, moleküler kütleleri yaklaşık 10 ila 18 kDa arasında değişen tek polipeptit zincirlerinden oluşur. 2S albumin depolama proteinleri (16 kDa) ve metiyonin açısından zengin 2S proteinleri (12 kDa) dahil olmak üzere çeşitli formlarda bulunabilirler. 9 civarında izoelektrik noktaları vardır, bu da alkalın protein oldukları anlamına gelir (Hadidi vd., 2024).

Ayçiçeğindeki fenoliklerin, özellikle doğal klorojenik asidin proteinlerin çözünürlüğünü azalttığı bilinmektedir. Ancak fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması her zaman proteinin çözünürlüğünü arttırmaz. Nitekim APK'lar üzerine yapılan bazı çalışmalarda fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasından sonra çözünürlüğün daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. API'da bulunan doğal fenolik bileşiklerin protein çözünürlüğü üzerindeki etkisi hala net değildir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Ayçiçeği albuminleri membran filtrasyonu kullanılarak izole edildiğinde protein çözünürlüğünde (%74) önemli bir artış elde edildi. Genel olarak ayçiçeği proteinlerinin çözünürlüğü çeşitlilik, iklim koşulları, tarımsal uygulamalar, ekstraksiyon yöntemleri ve saflaştırma teknikleri gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Hadidi vd., 2024).

AKP'lerin minimum çözünürlüğünün pH 5.0 civarında olduğu ve pH 9'a yükseltildiğinde yaklaşık %74,5'e çıktığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ayçiçeği protein izolatlarının ve konsantrasyonlarının çözünürlüğünün pH 8'de %60'ı aştığı rapor edilmiştir (Tessier vd., 2020).

Ayçiçeği çekirdeğinden elde edilen API'nın değişen pH aralığında (3.0, 5.0, 7.0, 9.0 ve 11.0) su bağlama özellikleri karşılaştırıldığında en yüksek su tutma kapasitesi pH 11.0, en düşük su tutma kapasitesi ise pH 5.0 olduğu görülmüştür (Gültekin Subaşı vd., 2022).

Araştırmacılar, alkali ekstraksiyonla izole edilen AKP'lerin su bağlama kapasitesi ve yağ bağlama kapasitesinin sırasıyla, 0,98 g su/g protein ve 2,06 g yağ/g protein olduğunu bildirmiştir (Tessier vd., 2020).

Fenolik bileşiklerin su bağlama kapasitesini, emülsiyon stabilitesini ve protein jellerinin sertliğini azalttığı, antioksidan kapasitesini ve nihai ürünün yeşilimsi rengini arttırdığı da belirtmiştir (Gültekin Subaşı vd., 2022).

### **2.2.6. Ayçiçeği Proteinlerinin Diğer Maddelerle Etkileşimleri ve Stabilitesi**

Protein bazlı bir köpüğün üretimi tipik olarak proteinler ile diğer maddeleri içeren sulu bir çözeltinin çırpılmasıyla elde edilir. Bir proteinin köpük oluşturma potansiyeli, köpük oluşturma kapasitesi (KK) ve köpük stabilitesi (KS) cinsinden ölçülebilir. KK, çırpma işleminden hemen sonra belirli bir miktarda proteinden üretilen köpüğün başlangıç miktarıyla ilişkiliyken, KS, köpüğün oluştuktan sonra çökmeye karşı direncini temsil eder (Tessier vd., 2020).

Ayçiçeği proteini küspesinin en yüksek emülsifiye etme kapasitesini pH 7.0'da ve en düşük pH 4.5'te sergilediği rapor edilmiştir. 4.5 pH değerinde azalan emülsifikasyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi, proteinlerin izoelektrik noktaları yakınında aşırı toplanmasına bağlanabilir (Hadidi vd., 2024).

### **2.3. Peynir Altı Suyu Proteinleri**

Peynir altı suyu; laktoz, proteinler, yağlar, suda çözünen vitaminler, mineral tuzları ve mikrobiyal büyüme için diğer gerekli besin maddelerinden oluşan peynir yapım sürecinin bir yan ürünüdür (Nielsen, 2018).

Küresel olarak üretilen peynir altı sularının yalnızca %50'si ürün formüle etmek için kullanılmaktadır. Arıtılmadan kamu kanalizasyon sistemlerine atılan peynir altı suları ne yazık ki kritik bir kirlilik sorunu yaratmaktadır (León-López vd., 2022).

Peynir altı suyunun bertarafı, yüksek organik içeriği ve çevre üzerindeki potansiyel etkisi nedeniyle farklı zorluklar ve endişeler doğurduğundan, peynir altı suyunu katma değerli ürünlere dönüştürmek, böylece atık miktarını azaltmak ve yalnızca çiftlik hayvanlarını beslemekle yetinmeyerek, kaynakları en üst düzeye çıkarmak için

yenilikçi teknolojiler ve süreçler üzerine arařtırmalar yapılması çok önemlidir (Petrović vd., 2024).

Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında çökeltme ve pıhtının uzaklaştırılmasından arta kalan sıvıdır. Peynir altı suyu, çoğunluğu (%90-94) sudan oluşan, aynı zamanda yüksek ve çeşitli organik içeriğe sahip, bulanık sarımsı bir sıvıdır (Ramos vd., 2016). Her 10 L süttten 9 L peynir altı suyu üretilmektedir (León-López vd., 2022). Peynir altı suları bu yüksek üretim nedeniyle çevre için ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Seçici gözenekli membranlara dayalı ayırma teknolojilerindeki ilerlemeler peynir altı suyu bileşenlerinin yüksek kalitede izolasyonuna ve fraksiyonlanmasına imkân vermiştir (Ramos vd., 2016). Peynir altı sularının besin değeri yüksek ve sindirime yardımcıdır. Toplam proteinin yaklaşık %20'sini oluşturur (Amaya-Farfan vd., 2016).

Hem hayvanlar hem de insanlar üzerinde yapılan çalışmalar, peynir altı suyu tüketiminin hem insülin üretimini hem de duyarlılığını arttıran mekanizmalar aracılığıyla kan şekeri seviyelerini düşürmeye yardımcı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak hidroliz edilmemiş (veya parçalanmamış) peynir altı sularının tamamının tip 2 diyabet hastalarında etkili olduğu, ancak hidrolizatın insanlarda henüz denenmediği bildirilmiştir (Amaya-Farfan vd., 2016).

Peynir altı suyu proteini peptitlerinin önemi fonksiyonel özellikleriyle ilişkilidir. Bazı çalışmalar, bu peptitlerin, anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ACE) inhibitörleri olarak, kan basıncının düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi üzerindeki etkisini göstermiştir. Bu hidrolizatlar aynı zamanda geriatrik bölgedeki hastalarda ( $\pm 65$  yaş ve üzeri), hafızayı geliştirerek dopaminin artmasına da yardımcı olur. Gıda endüstrisinde peynir altı suyu proteini peptitleri antimikrobiyal, antioksidan aktiviteler ve ayrıca emülsifiye edici özellikler sunar. Peynir altı suyu proteini hidrolizatlarının tüm fonksiyonel özellikleri moleküler ağırlıklarıyla ilgilidir. Bu özellikler, protein yapı kompleksinin oluşumu sırasında gizli bir durumdadır ve yalnızca bu yapı enzimatik etki, kimyasal hidroliz gibi farklı yöntemlerle ve ultrason ve ısıl işlemler gibi yeni gelişen teknolojilerin uygulanması yoluyla kırıldığında veya hidrolize edildiğinde etkinleştirilir (León-López vd., 2022).

$\beta$ -Laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbümin, proteolitik enzimlerle sindirim sonrasında birçok ACE (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) inhibitör peptidi serbest bırakır. ACE-inhibitör peptitler ayrıca jelatin, mısırdan  $\gamma$ -zein, buğday tohumundan, arpadan

hordein, ovalbumin, ayçiçeği, sarımsak, kurutulmuş palamut hidrolizatlarından da izole edilmiştir (Möller vd., 2008).

### **2.3.1. Yüksek Katma Değerli Bileşen Olarak Peynir Altı Suyu Proteinleri**

Peynir altı suyunun değerlendirilmesi temel olarak laktozun, proteinlerin veya diğer besin maddelerinin konsantrasyonuna ve yeni katma değerli bileşiklere dönüştürülmesine odaklanır (Sebastián-Nicolás vd., 2020), (Valdez Castillo vd., 2020). Peynir altı suyundan bazı katma değerli bileşikler, enzimatik, mikrobiyal, termal, galakto-oligosakkarit probiyotikler (GOS), laktoz yağ asidi esterleri, biyorendiriciler, aroma bileşikleri ve bakteriyel selüloz gibi farklı biyoteknolojik yaklaşımlardan ekstrakte edilmiştir (Lappa vd., 2019).

Galakto-oligosakkaritler (GOS), konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık açısından fayda sağladığı bilinen iyi bir probiyotik veya substrat sınıfıdır (Gibson vd., 2017). GOS'un, yararlı bağırsak bakterilerinin büyümesinin seçici olarak uyarılması, bağırsakta normal flora dengesinin korunması, kalsiyum emiliminin artması ve serum kolesterol seviyelerinin ve kanser risklerinin azalması dahil olmak üzere insan sağlığına çeşitli faydaları vardır. GOS'un sağlığı geliştiren etkileri arasında diğerlerinin yanı sıra immünomodülasyon, lipit metabolizması, mineral emilimi, kilo yönetimi ve obezite ile ilgili konular yer almaktadır (Duan vd., 2021; Duncan vd., 2020; Torres vd., 2010).

Laktoz yağ asidi esterleri, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrileri için yüksek öneme sahip, kokusuz, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bileşiklerdir. Laktoz yağ asidi esterleri, sentetik yüzey aktif maddelerin çekici ikameleri olarak, gıda ürünlerinde mükemmel emülsifiye edici ve stabilite özellikleri nedeniyle tanınmıştır. Ek olarak, birçok gıda kaynaklı patojene karşı antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra antikanser aktivitesi gibi tıbbi özellikler de sunarlar (Barba, 2021; Enayati vd., 2018; Staroń vd., 2018).

Karotenoidler en önemli doğal pigmentlerden biridir ve genellikle bitkilerden elde edilebilir. Ancak peynir altı suyu veya deproteinize peynir altı suyu, glikoz, sakaroz ve ksiloz gibi çeşitli karbon kaynaklarının fermantasyonu için çeşitli mikroorganizmalar (*Blakeslea trispora*, *Mucor azygosporus*, *Rhodotorula rubra*) karotenoidlerin üretiminde kullanılmaktadır. Karotenoidler antioksidan aktivite,

kardiyovasküler hastalıkları azaltma, antidiyabetik, anti-kanser ve antiinflamatuvar aktiviteler gibi biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Peynir altı suyundan elde edilen karotenoidlere olan ilgi, üretim maliyetlerini azaltmak için düşük maliyetli substratların kullanımına odaklanmaktadır (Eggersdorfer ve Wyss, 2018). Fermantasyon ayrıca peynir altı suyundan doğal aroma bileşiklerinin üretimi için alternatif bir yoldur ve *Metschnikowia pulcherrima*, *Bacillus licheniformis*, *Wickerhamomyces pijperi* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi çeşitli maya türlerinin kullanımını içerir (Chreptowicz vd., 2018; Izawa vd., 2015; X. Li vd., 2017; Türkel vd., 2014).

### **2.3.2. Dünya Peynir Altı Suyu Pazarı ve Türkiye'deki Durumun İncelenmesi**

Peynir altı suyu laktoz, kazein ve protein tozu üretimi için kaynak olarak kullanılabilse de, peynir altı suyunun yaklaşık %50'sinin hala atık su arıtma tesislerinde bertaraf edildiği veya hayvan yeminde kullanıldığı tahmin edilmektedir (Pescuma vd., 2015). Bir çalışma, dünya çapında 1,15x10<sup>8</sup> ila 1,60x10<sup>8</sup> ton peynir altı suyu üretildiğini ve bu miktarın peynir altı suyu tozu üretimi gerekliliklerini aştığını gösterdi (Koller vd., 2013). Peynir altı suyu, laktoferrin veya laktoferrisin gibi proteinler üretmek için kullanıldığında, laktoz açısından zengin peynir altı suyu retentatı, atılması gereken bir atık malzeme olarak kalır. Ayrıca asit peynir altı suyu, süzme peynir, krem peynir ve süzme yoğurt imalatının bir yan ürünüdür. Asit peynir altı suyu hayvan yemi olarak kullanılabilirken, yüksek asit içeriği nedeniyle geleneksel peynir altı suyu protein konsantrelerine işlenmesi zordur (Pescuma vd., 2015; Lievore vd., 2015; Chandrapala vd., 2015). Peynir altı suyunun bertaraf edilmesi şu anda süt endüstrisinin karşı karşıya olduğu dikkate değer bir sorundur (Giroto vd., 2015). Düşük maliyetli bir karbon kaynağı olmasının yanı sıra peynir altı suyu, enzimler veya asit yöntemleri kullanılarak hidroliz yoluyla fermantasyonda kullanım için kapsamlı bir ön işlem gerektirmemesi avantajına sahiptir (Gomez vd., 2012; Nielsen, 2018).

### **2.3.3. Peynir Altı Suyu Ultra Filtrasyonu (UF)**

Başlıca peynir altı suyu proteinleri  $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbüminin yanı sıra, immünoglobulinler, laktoferrin, büyüme faktörleri, laktoperoksidaz ve diğer değerli enzimler gibi çok sayıda biyolojik olarak aktif küçük peynir altı suyu

proteini peynir altı suyunda bulunabilir. Fermente süt ürünlerinin üretimi için, genellikle çok yoğun ısıtma koşulları uygulanır (örneğin, 5 dakika boyunca 90°C), bu da doğal peynir altı suyu proteininin muazzam bir şekilde kaybolmasına neden olur. Peynir altı suyu proteini için artan piyasa fiyatları termal süt işlemleriyle ilgili olarak yeniden düşünmeye yol açabilir. Ancak sadece orta düzeyde ısıtma koşulları uygulansa bile, peynir altı suyundaki doğal protein konsantrasyonu %0.55 ile %0.75 arasında düşük konsantrasyonlarda kalmaktadır. Sonuç olarak, filtrasyon teknolojisi bu değerli bileşenlerin zenginleştirilmesinde merkezi bir anahtardır (Fabian Ostertag, vd., 2023).

#### **2.3.4. Peynir Altı Suyu Hidrolizatlarının Hazırlanması**

Peynir yapımında kullanılan süt, peynir mayası (rennet) veya asit ile pıhtılaştırılır. Bu sayede peynir ve peynir altı suyu ayrılır. Pıhtılaştıran peynir süzülür, geriye kalan sıvı, peynir altı suyu olarak toplanır. Toplanan peynir altı suyu, enzimler veya asit ile hidrolize edilir. Bu işlem ile peynir altı suyu proteinleri daha küçük peptitler ve amino asitlere parçalanarak proteinlerin sindirimi ve biyoyararlanım artırılır. Hidroliz işleminin ardından, karışım filtrelendir ve kurutulur. Bu sayede hidrolizatın saflaştırılması ve toz forma getirilmesi sağlanır (Rout vd., 2024).

#### **2.3.5. Peynir Altı Suyu Proteinleri Eldesi**

Hidroliz edilmiş peynir altı suyu, ultrafiltrasyon (UF) membran sistemleri ile konsantre edilir. Membran kasetleri filtrasyon verimliliği sağlar ve enerji tüketimini azaltır. Bu aşamada, laktoz, mineral vb. düşük moleküler ağırlıklı bileşenler ayrılırken, yüksek moleküler ağırlıklı proteinler tutulur (Ashaolu vd., 2020).

#### **2.3.6. Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Teknik ve Fonksiyonel Özellikleri**

Peynir altı suyu peptitleri antihipertansif, antiviral, antikanser, bağışıklık ve antioksidan gibi mükemmel fonksiyonel özelliklere sahiptir ve kardiyovasküler, sindirim, endokrin, bağışıklık ve sinir sistemine fayda sağlar (León-López vd., 2022).

Peynir altı suyu, süt hacminin yaklaşık %85-95'ini temsil eder ve mineraller, proteinler ve laktoz gibi %55'ten fazla süt besin maddesi içerir (Kaminarides vd., 2020; Guo ve Wang, 2019).

Tatlı ve asitli peynir altı suyu, sütün pıhtılaşması enzimatik etki (rennet) veya sonradan asitlerin ilavesi gerçekleştirildiğinde elde edilir (AL-Razaq, 2019; Shenana, 2021).

Peynir altı suyunda en çok bulunan besinler şunlardır; laktoz, çözünür proteinler, lipitler ve mineral tuzları. Diğerlerinin yanı sıra NaCl, KCl ve kalsiyum tuzları (ncelikle fosfat) gibi bazı nötr tuzların ek varlığıyla. Peynir altı suyu bu besinlerin yanı sıra laktik ve sitrik asitleri, üre ve ürik asit gibi protein olmayan nitrojen bileşiklerini ve B grubu vitaminlerini de içerir (AL-Razaq, 2019; Smithers, 2008).

Peynir altı suyu çok sayıda besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif bileşiğin değerli bir kaynağı olarak kabul edilir. Peynir altı suyu, çok yönlü sağlık odaklı bileşikler üretmek için kullanılabilecek yüksek bir laktoz ve protein içeriği sunar (Kareb ve Aider, 2019), aynı zamanda çözünebilir proteinleri ve yüksek düzeyde amino asit, B vitaminleri, laktoz ve tuz içermesi nedeniyle değerli bir ürün olarak kabul edilir. Peynir altı suyu sırasıyla %55-75 ve %40-70 B6 vitamini ve B12 vitamininin yanı sıra tiamin, nikotinik asit, folik asit ve askorbik asit, riboflavin ve biyotin içerir. Bununla birlikte, asit pıhtılaşmasıyla karşılaştırıldığında enzimatik işlem sırasında peynir altı suyunda önemli bir B12 vitamini konsantrasyonu yer değiştirir. Peynir altı suyu proteinleri, izolösin, lösin ve valin gibi yüksek miktarda esansiyel ve dallı amino asitler içerir (Singh vd., 2014). Farklı metabolik fonksiyonların düzenleyicileri, kan şekeri homeostazisi ve sülfür içeren amino asitlerin dengeli bir kaynağı olarak önemli bir rol oynarlar. Peynir altı suyunda kalsiyum, magnezyum, fosfor ve eser miktarda çinko gibi mineraller bulunur ve elektrolitlerin temeli olarak işlev görebilir (Deeth ve Bansal, 2019).

Beta-Laktoglobulin, toplam proteinin yaklaşık %50'sini ve süt proteininin yaklaşık %10'unu temsil eden, ısıyla pıhtılaşabilen proteinlerin ana peynir altı suyu proteindir. Molekül ağırlığı 8,36 kDa ile 18,20 kDa arasında değişmektedir. Bir sülfhidril grubu ve iki disülfid bağından oluşan ve 162 amino asitlik bir peptid zincirinden oluşan iki özdeş alt birimin dimeridir. Bu proteinin çözünürlüğü pH'a ve iyonik kuvvete bağlıdır. Isı denatürasyonu 70–75°C arasında gerçekleşir (Yadav vd., 2015). β-Laktoglobulin anne sütünde bulunmaz ve inek sütü ürünleriyle beslenen bebeklerde bazı alerjik

reaksiyonlardan sorumlu olduğu düşünölmektedir. Bu nedenle peynir altı suyu bazı insan sütünü taklit eden ticari ürünler bulunmaktadır. Geleneksel olarak,  $\beta$ -laktoglobulin, genellikle iyon değiştirme kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerle karakterize edilen  $\beta$ -laktoglobulin dışındaki tüm serum proteinlerinin çökmesine neden olmak için pH'ta ısıtılmalı veya ısıtmasız amonyum sülfat ile fraksiyonel çökeltme yoluyla ayrılır (Schlatterer vd., 2004).

Peynir altı suyunun fonksiyonel aktiviteleri bileşimiyle ilgilidir. Laktoz, magnezyum ve çinkonun emilimini artırır ve ishal tedavisinde daha iyi kabul edilir. Ek olarak, peynir altı suyu proteinleri önemli biyolojik aktivite ve amino asitlerin yüksek kaliteli besin kaynağı, anti-mikrobiyal aktivite, faydalı mikrofloranın (*Bifidobakteriler*) büyümesinin artırılması, bağışıklık artırıcı özellikler ve kanser ve kanser gibi belirli hastalıkların kontrolü dahil olmak üzere antitoksin aktivitesi vb. benzersiz fonksiyonel özellikler gösterir (Kaminarides vd., 2020; Kareb ve Aider, 2019; Macwan vd., 2016; Anil Panghal vd., 2018).

Peynir altı suyunun büyük besin değeri nutrasötik faydaları artırır, ateroskleroza, obeziteyi, diyabeti ve kanser riskini azaltır; ayrıca peynir altı suyundaki kükürt amino asitlerinin varlığı, tek karbonlu metabolizmada güçlü hücre içi hücre takviyesi glutasyonun öncüsü olarak kanser önleme maddeleri olarak görev yapar. Peynir altı suyu kısa ve uzun vadede gıda alımı düzenlemesini etkileyen tokluk sinyalleri sağlayarak vücut ağırlığının düzenlenmesine katkıda bulunabilir. Bu özelliği sayesinde fonksiyonel gıda ürünü olarak da tercih edilebilmektedir. (Macwan vd., 2016; Shenana, 2021; Król vd., 2017).

Peynir altı suyu proteini, obezite gibi metabolik hastalıkları önlemeyi veya iyileştirmeyi amaçlayan diyetle ideal bir içerik olarak seçilmiştir. Peynir altı suyu proteinleri iştahı azaltır ve tokluk hormonlarının düzenlenmesi ve hepatik glukoneogenezin değiştirilmesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tokluğu artırır (Boscaini vd., 2020; Jakubowicz vd., 2017). Ek olarak, peynir altı suyu proteini vücut kompozisyonunu optimize etmede önemli bir bileşendir. Bu özelliği ile direnç egzersizlerini tamamlayacak şekilde kas kütesini, kas gücünü ve kas hipertrofisini destekler. Daha hızlı sindirimi nedeniyle diğer protein kaynaklarına göre protein sentezini daha verimli bir şekilde uyarır. Bu özellik, özellikle esansiyel amino asitler olmak üzere plazma amino asit seviyelerinde daha hızlı bir artışa yol açar (Cereda vd., 2019; Devries ve Phillips, 2015; Nabuco vd., 2018; Smith vd., 2018). Ayrıca, peynir

altı suyu proteini alt fraksiyonları olan  $\alpha$ -laktalbümin ve laktoferrin tümör yollarını engellediğinden, spesifik anti-kanser etkileri vardır (Teixeira vd., 2019). Peynir altı suyu, dallı zincirli amino asitlerin hızlı emilimini artırarak vücutta olumlu etki gösterir. Peynir altı suyunun, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitör özelliği ve izolösin-prolin-alanin tripeptid bileşeninden nitrik oksit aracılı vazodilatasyonu artırması nedeniyle kan basıncını düşürme yeteneği olduğu gösterilmiştir. Ayrıca peynir altı suyu proteini tüketimi, lipoprotein lipazı teşvik ederek ve kolesterol emilimini inhibe ederek lipid metabolizmasını iyileştirebilir (Lee ve, Hur, 2017; Skrzypeczak vd., 2019; Kamonkiat Wirunsawanya vd., 2017).

$\alpha$ -Laktalbümin, toplam peynir altı suyu proteinlerinin %11'ini temsil eder. Kalsiyuma karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve esas olarak triptofan ve sistein ile temsil edilen esansiyel amino asitlerin mükemmel bir kaynağıdır. Bu protein yapı olarak %72 oranında benzer olduğundan insan  $\alpha$ -laktalbüminine homolog kabul edilebilir.  $\alpha$ -laktalbüminin moleküler ağırlığı yaklaşık 14 kDa'dır. 63°C'de dört disülfid ve denatüre olan kompakt küresel bir yapıya sahiptir, ancak soğuduğunda doğal durumuna geri döner. Peynir altı suyu, triptofan, lizin, dallı zincirli amino asitler ve kükürt içeren amino asitler dahil olmak üzere biyoaktif peptitlerin ve esansiyel amino asitlerin önemli bir kaynağıdır. Bunların hepsi bebek beslenmesi için hayati öneme sahiptir (Layman vd., 2018). Sekiz sistein kalıntısı içeren 123 polipeptitten oluşur.  $\alpha$ -laktalbümin, daha iyi bilişsel performansla yol açan plazmadaki artan triptofan seviyeleri, iyi lipid oksidasyonu, minerallerin daha iyi emilmesi, antibakteriyel aktivite, immünomodülatör etkiler ve antitümör aktivite gibi başka faydalar da gösterir (Yadav vd., 2015; Modler, 2009).

İmmüoglobulinler sütteki toplam proteinin %2'sini temsil eden peynir altı suyundaki en büyük proteinlerdir. Bu proteinler üç ana sınıftan oluşur; immüoglobulinler IgG, IgA ve IgM. Her form aynı temel yapıya sahiptir; 23 kDa'lık iki özdeş hafif zincir ve 53 kDa'lık iki zincir. Bununla birlikte IgG monomerik formda, IgA dimerlerde ve IgM tetramerlerde bulunur. İmmüoglobulinler ısıya karşı nispeten stabildir ve gastrointestinal bozukluk riskini azalttığı için fonksiyonel gıdalar olarak dahil edilmiştir (Wijayanti vd., 2014; Heidebrecht ve Kulozik, 2019). Ana işlevi bakterileri kapsüllemek, toksinleri nötralize etmek ve virüsleri etkisiz hale getirmektir. Ayrıca mide sindirimini destekleyebilir, kolesterol seviyelerini düşürerek kan basıncını

düşürebilir ve çocuklara yönelik süt formüllerinde süt yerine kullanılır (Yadav vd., 2015; Modler, 2009).

Sığır serum albümini (BSA), toplam süt proteinlerinin yaklaşık %5-6'sını temsil eder ve moleküler ağırlığı 66,2 ila 66,5 kDa arasında değişir. 583 amino asit kalıntısı içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşur. Sistein (Cys) amino asit kalıntılarının çapraz bağlı 17 disülfid köprüsü yapıyı stabilize eder. Denatürasyon sıcaklığı 4°C'dir. Aynı zamanda esansiyel amino asitlerin kaynağıdır. BSA, yağ asitleri, amino asitler, ilaçlar ve inorganik iyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli ligandları bağlayabilir ve dolaşım sistemindeki endojen ve eksojen bileşiklerin birincil taşıyıcısı olarak kabul edilir (Jahanban-Esfahlan vd., 2019; Cheng vd., 2018).

Bu proteinlerin işlevselliğinin, insan meme kanseri hücreleri inhibitör potansiyelleri, opioid agonist aktiviteleri ve antihipertansif özellikleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sharma, 2019; Koh vd., 2019).

Bu, transfer proteinleri ailesine ait olan ve genellikle memeli sütü, gözyaşı, mukus ve tükürüğün ekzokrin salgılarında bulunan demir bağlayıcı bir glikoproteindir (Modler, 2009; Wang vd., 2016). Sığır sütünde 0,1-0,2 g/L konsantrasyona sahip küçük bir bileşendir ve 9,5-10 civarında yüksek izoelektrik noktası ile 80 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. 700 amino asitten oluşan zenceksiz bir polipeptit zincirinden oluşur; bu zincir bir veya iki karbonhidrat zinciri içerebilir. Bu protein, bir a-helis yapıyla birbirine bağlanan, oldukça homolog iki lob halinde düzenlenmiş tek bir polipeptit zincirinden oluşur. Her lob bir ferrik demir bağlama bölgesi içerir. 16 molekül içi disülfid bağına sahiptir ancak serbest bir sülfhidril grubu yoktur (H. Deeth ve Bansal, 2019). Laktoferrin molekülleri ısıya dayanıklı olup pH 4'te asitlere karşı dayanıklıdır; ayrıca trypsin ve kimotripsin etkisine karşı dirençlidirler ancak pepsin ile hidrolize edilebilirler (Sharma, 2019; Wang vd., 2020). Pepsin, gıda sindirimi sırasında midede üretilen ana proteolitik enzimdir. Pankreatin, pankreas tarafından ince bağırsakta salınan, trypsin, kimotripsin ve elastaz gibi proteazları içerir (Megías, Pedroche, Del Mar Yust, vd., 2009). Demiri bağlama yeteneği, bakteri ve mantar büyümesinin inhibisyonu, belirli hücre hatlarının teşviki, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ve demirin vücutta iyi emilimi gibi çeşitli biyolojik işlevler sağlar. Uygulamaları arasında sağlık takviyeleri, fonksiyonel gıdalar ve içecekler, bebek mamaları, kozmetikler ve ağız bakım ürünleri yer almaktadır (Sharma, 2019; Wang vd., 2020).

Laktoperoksidaz, memelilerin meme, tükürük ve gözyaşı bezlerinde bulunan, 78 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Bu enzim, 612 amino asitten oluşan benzersiz bir polipeptit zinciridir. Laktoperoksidaz ısıya göreceli olarak stabildir, pastörizasyon işlemine (72°C, 15 s) dirençlidir ve 78°C'de inaktive edilebilir. Bu glikoprotein, yağ asitleri, aromatik aminler, fenoller ve aromatik asitler dahil olmak üzere çeşitli substratların oksidasyonunu katalize edebilir (E. Silva vd., 2020). Laktoperoksidaz, emziren meme bezinin ve yenidoğanların bağırsak yolunun patojen mikroorganizmalara karşı korunmasında önemli bir rol oynar; gıda ambalajına yönelik filmlerin üretiminde diğer malzemelerle birlikte de kullanılabilir. Ayrıca bazı kanserojenlerin parçalanmasında ve hayvan hücrelerinin peroksidatif etkilere karşı korunmasında da rol oynar. Tüm bu fonksiyonel özellikler bu enzimin gıda, kozmetik, ilaç ve tarım endüstrilerinde kullanılmasına olanak sağlar (Urtasun vd., 2017; Shokri ve Ehsani, 2017).

Proteaz peptonlar, peynir altı suyu proteinlerinin heterojen bir karışımı olarak tanımlanır; Termostabildir ve asit pH değerlerinde çözünür. Isıl işlem ve pH'ın 4.6'ya ayarlanmasıyla ayrılabilir. Proteoz pepton 3 (PP3), proteoz peptonun ana faktörünü temsil eder, düşük molekül ağırlıklı fraksiyona ve yüzey aktif özelliğe sahip fosforile edilmiş bir glikoproteindir. Soya fasulyesi yağı ve dondurma içeren ürünlerde kullanılan su içinde yağ emülsiyon modelinde iyi bir emülsifiye edici aktivite gösterdiği için proteaz-peptona gıda endüstrisinde büyük ilgi vardır. Mükemmel köpük oluşturma özellikleri sunar (Innocente vd., 2011) ve süt asidik koşullar altında 95°C'de 20 dakika ısıtıldığında çözünebilir kalan süt kısmıdır. Bu protein bir immünomodülatör, anti-bakteriyel olarak görev yapar ve aynı zamanda lipaz aktivitesini de inhibe eder (Yadav vd., 2015; Karamoko vd., 2016).

Glikomakropeptid (GMP), peynir altı suyunda bulunan ve  $\kappa$ -kazein proteinleri üzerindeki enzimatik etkinin (rennin) etkisiyle ayrılan bir peptittir. Kazein makropeptidinin glikolize formudur. Glikomakropeptid, 6.8 kDa molekül ağırlığına sahip, 64 amino asitten oluşan çözünür bir peptittir. Başta galaktozamin, galaktoz ve sialik asit olmak üzere değişken miktarlarda oligosakarit içerir; yiyecek, içecek, kozmetik, fonksiyonel ve tıbbi takviyelerde uygulanması için bir bileşen olarak mevcuttur ve ayrıca biyolojik faydalar ve anti-enfektif ve antioksidan aktivitelerle de ilişkilidir (Chungchunlam vd., 2014; O'Riordan vd., 2018).

GMP'li gıda takviyesi, bir immünomodülatör ve anti-inflamatuar protein görevi gördüğü için çeşitli sağlık potansiyelleri ortaya çıkarır. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* sp. üzerinde prebiyotik etkiye sahiptir. Aynı zamanda kalsiyum emilimini artırır, kemik sağlığını iyileştirir ve *Sobrinus*, *Sanguis* ve *Streptococcus mutans* (H. Deeth ve Bansal, 2019; Sharma, 2019; Mehra vd., 2021) dahil olmak üzere birçok karyojenik bakterinin yapışmasını engeller (León-López vd., 2022).

Hidrolize peynir altı suyu sırası ile antihipertansif, antiviral, antidiyabetik, antioksidan ve kanser önleyici fonksiyonel özelliklere sahiptir.

Peynir altı suyunun biyolojik fonksiyonları temel olarak kardiyovasküler, sindirim, endokrin, bağışıklık ve sinir sistemleriyle ilgilidir. Ancak biyoaktif peptitlerin çoğu doğal peynir altı suyu proteininde şifrelenmiştir, bu nedenle bu peptitleri serbest bırakmak için süt peynir altı suyu hidrolizatları üreten hidroliz yöntemlerinin uygulanması gerekir. Son yıllarda süt peynir altı suyu hidrolizatları, bağışıklık, antioksidan, antikanser, antiviral ve antihipertansif gibi sağlık üzerinde faydalı etkiler üretebilen fonksiyonel bir bileşen olma potansiyelleri nedeniyle araştırılmaktadır. Aynı zamanda hidrolizatların üretimi, peynir altı suyu proteinine değer katma ve aynı zamanda çevreyi kirletici etkilerinden koruma açısından ilginç bir yaklaşım olabilir (Dullius vd., 2018; Nasri, 2017; Ballatore vd., 2020; Silva vd., 2014).

Hipertansiyonun yönetimi çok faktörlü bir konudur. Antihipertansif etkinlik için ACE inhibitör ilaç reçetesi, kilo kaybı dahil yaşam tarzı değişiklikleri, sigarayı bırakma, sodyum ve alkol alımını azaltma gibi önlemeye yönelik çeşitli faaliyetlerden istifade edilmektedir. Bu önerilerin yanı sıra, fermantasyon yoluyla elde edilen süt türevi peptitler, mükemmel ACE engelleme kapasitesi ve dolayısıyla kan basıncını düşürücü etki göstermektedir (Bhat vd., 2014).

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında ölümlerin ana nedenidir. Renin-anjiyotensin sistemi kan basıncını kontrol eden yoldur. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), vücuttaki kan basıncını değiştirmekten sorumludur. ACE, vazokonstriktör etki sağlayarak anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüştürülmesinden sorumludur (Cracowski ve Boutouyrie, 2016). Bu hastalıkları kontrol altına almak için sentetik ilaçların kullanılması öksürük, tat alma bozukluğu ve deri döküntüsü gibi çeşitli yan etkilere neden olur. Bu nedenle, arteriyel

hipertansiyonun önlenmesi ve/veya tedavisi için bir alternatif, antihipertansif peptitler gibi doğal kaynaklardan (hayvan veya bitkisel) elde edilen biyoaktif bileşenlerin kullanılmasıdır (Herrera-Ponce vd., 2019; Bhat vd., 2014; Fuentes-García, 2017).

Çeşitli çalışmalar ACE inhibisyonu için peptitlerin etki mekanizmasını göstermiştir. İki farklı noktada açıklanabilir. İlki, fizyolojik önemden kaynaklanmaktadır, gastrointestinal sindirim ve taşınma, peptitlerin biyoyararlanımının önündeki ana engeller olduğundan, peptitlerin oral yoldan verilmesi, antihipertansif etkilerini göstermek için aktif bir formda kan dolaşımına ulaşır. İkincisi, gastrointestinal proteazlar yoluyla peptitlerin sindirimi, ACE inhibitör kapasitesine sahip peptitlerin üretimi için bir süreç olarak kullanılabilir (Miralles vd., 2018).

Miralles ve arkadaşları (Miralles vd., 2018) antihipertansif peptitlerin incelenmesi alanında ilerlemeler bildirdiler. Gıdalardan elde edilen antihipertansif peptitlerin sağlıklı beslenmede iyi bir fonksiyonel ajan kaynağı olduğu sonucuna vardılar. Bununla birlikte, oral alımdan sonra, bu peptitler sindirim ve emilim sırasında hidrolize edilir ve böylece daha güçlü ve daha kalıcı bir antihipertansif etki gösterdiği ortaya çıkan daha kısa peptit formları elde edilir. Bu peptit biyotransformasyonu, *in vitro* ACE inhibitör aktivite tekniğinin antihipertansif etkisini göstermek için yeterli olmamasının nedenidir. ACE aktivitesini engellemeye yönelik peynir altı suyu peptitleri üzerine yapılan çalışmalar çok azdır; bunun nedeni  $\beta$ -laktoglobulinin yapısının sindirim enzimlerine dirençli olması olabilir (Hammam vd., 2017).

Valil-prolil-prolin (Val-Pro-Pro) ve izölösil-prolil-prolin (Ile-Pro-Pro) gibi kazeinden türetilen tripeptitler *in vivo* olarak gösterildiği gibi mükemmel antihipertansif özellikler sunduğu iyi bilinmektedir (Jahandideh ve Wu, 2020), (Beltrán-Barrientos vd., 2016). Fermente süt ve kazein hidrolizatları içeren bu biyoaktif tripeptitlerin ağız yoluyla alınmasının, apolipoprotein E eksikliği olan farelerde ateroskleroz gelişimini zayıflatması gibi ek faydalar da rapor edilmiştir (León-López vd., 2022).

Antiviral peptitler sentetik terapötik maddelere ideal alternatifler olarak kabul edilir. Peptit etkisinin mekanizması yapılarına bağlıdır ve doğal formun modifikasyonu ile geliştirilebilir. Peptitlerin antiviral etkisi üç mekanizma yoluyla oluşturulabilir; (I) virüs yapışmasını ve hücre zarı füzyonunu engelleyen peptitler; (II) viral zarfı bozan peptitler; ve (III) viral polimeraz ile etkileşime girerek virüs replikasyonunu inhibe

eden peptitler. Laktoferrin ve hidrolizatları, virüs benzeri adenovirüs, çocuk felci virüsü, rotavirüs, hepatit B virüsü, Zika, dang virüsü, influenza virüsü A H1N1 ve solunum sinsityal virüsüne karşı antiviral multiaktiviteye sahiptir. Antiviral etki, virüsün kuluçka süresine, hidrolizatların konsantrasyonuna ve elde etme yöntemine bağlıdır. İzoelektrik noktası 10'un üzerinde olan bazik, alifatik ve polar amino asitlerden oluşan, moleküler ağırlığı 10 kDa'nın altında olan hidrolizatlar, amfipatik yapılar oluşturma kapasiteleri nedeniyle mükemmel antiviral etki gösterirler. İyi etkinlikleri, güvenli, seçicilikleri ve öngörülebilir metabolizmaları, ilaç üretiminde peptitlerin temel güçlü yönleridir (Skalickova vd., 2015; Ng vd., 2015; Garg ve Kumar, 2021; Ashaolu ve Ashaolu, 2020; Sitohy vd., 2020).

Kanser önleyici etkinliğinde ise gıda kaynaklı protein hidrolizatları veya izole edilmiş peptitler, çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla antikanser aktivitelere sahiptir. Bu, apoptozun uyarılmasını, hücre döngüsü işleyişinin durdurulmasını, hücre zarı hasarını, hücre yapışmasının inhibisyonunu, topoizomerazları, bağışıklık tepkisinin modülasyonunu ve hücre içi sinyallemenin inhibisyonunu içerir (Chalamaiah vd., 2018), (Umayaparvathi vd., 2014). Prolin, lösin, glisin, alanin gibi peptitlerin bazı baskın hidrofobik amino asitlerinin ve bir veya daha fazla lizin, arginin, serin, treonin ve tirozin kalıntısının antikanser aktivitesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Wang ve Zhang, 2017). Peptitlerin antikanser aktivitesi, amino asit kompozisyonu, sekansı ve hidrofobikliği gibi yapısal özelliklerine dayanmaktadır. Peptitlerin moleküler ağırlığı ne kadar düşükse, kanser hücresi bileşenleriyle etkileşimlerin moleküler hareketliliği ve yayılımı o kadar yüksek olur ve dolayısıyla daha güçlü antikanser aktivitesi olur. Laktoferrinden elde edilen peptitler metastazı azalttı ve tümörlerin büyümesinde önemli bir gecikme yaşadı (Chalamaiah vd., 2018; Kamal vd., 2018).

İmmünomodülatör aktivitenin mekanizması temel olarak makrofajların aktivasyonu, fagositozun uyarılması, lökosit sayısının artması, sitozinler, immünoglobulinler gibi immün modülatörlerin uyarılmasının artması, NK hücrelerinin uyarılması, splenositler üzerindeki uyarı etkisi ve mitojenle aktifleşen protein kinazın aktivasyonu yoluyla gerçekleşir. Bu mekanizma, peptitlerin immün yanıtları modüle edebildiği amino asit dizisine, bileşimine, uzunluğuna ve yapısına bağlıdır (Chalamaiah vd., 2018).

$\alpha$ -Laktalbümin, 123 amino asitten oluşan ve moleküler ağırlığı yaklaşık 14 kDa olan küçük bir proteindir (Smithers, 2008), (Permyakov ve Berliner, 2000). Bu proteinin

hidrolizi, antimikrobiyal (Pellegrini vd., 1999) ve immün sistemi uyarıcı (Cross ve Gill, 2000) özelliklerin yanı sıra antihipertansif (FitzGerald vd., 2004) bir etki sağlar. Proteinler, antikolar tarafından tanımlanan ve ardından alerjenik bir reaksiyonu tetikleyen, epitop adı verilen bölgeleri sunan antijenler olarak işlev görür (X. Li vd., 2016; Willison vd., 2013; Pomés, 2010).

İzotiyosinatlar sağlık özellikleriyle bağlantılıdır ve karnabahar, brokoli ve lahana gibi bitkilerde bulunan glukozinolatların parçalanması ile ortaya çıkar (Keppler vd., 2014; Guzmán-Pérez vd., 2016).

Spöttel ve ark., (Spöttel vd., 2021), yüksek performanslı kromatografi-immün boyama (HPTLC-IS) analizi kullanılarak, ayrıldıktan sonra doğrudan plaka üzerinde gerçekleştirilen doğal işlenmemiş ve benzil izotiyosiyanat (BITC) ile modifiye edilmiş  $\alpha$ -laktalbüminde immünojenik boyama gerçekleştirdi. HPTLC immün boyama prosedürünün proteinin üçüncül ve ikincil yapısını tahrip etmediğini bildirdiler. Proteinin BITC ile kimyasal modifikasyonu, protein molekülünün yapısal değişikliklerinden türetilmiş ve alerjenitedeki artışı etkilemiştir (León-López vd., 2022).

Peptit parçalarının antioksidan aktivitesi soya fasulyesi (Chen vd., 1998) ve bezelye tohumu (Pownall vd., 2010) gibi farklı bitkisel kaynaklarda araştırılmıştır. İçeceklerde, süt peynir altı suyu ve muz çarkıfelek meyvesinin besin özelliklerinin birleşimi, fenolik bileşiklerin varlığı nedeniyle içeceğin antioksidan özelliklerini artırdığı bildirilmiştir. Posanın içeriği ne kadar yüksekse, antioksidan aktivite o kadar yüksektir (Vivas vd., 2016). Ek olarak ekşi elma (Guimarães vd., 2019) ve ahududu eklenmiş peynir altı suyu sütüne dayalı sağlıklı fonksiyonel içeceklerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra antihipertansif aktivitelerini de artırdığı bildirilmiştir (Ferreira vd., 2019).

### **2.3.7. Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Benzerlik ve Farklılıkları**

Beyaz ve kaşar peynir rennet (peynir mayası) kullanılarak elde edilir ancak kaşar peyniri üretimi esnasında peynir altı suyu tamamen ayrılarak fermantasyona bırakılırken beyaz peynir üretiminde bir miktar peynir altı suyu bulunur. Genellikle pH değerleri 5.6 ve üzerindedir. Beyaz peynir altı suyu üretiminde, pıhtılaştırma ve kesme işlemleri sırasında peynir altı suyu ayrılır, ancak tamamen uzaklaştırılmaz.

Kaşar peynirde ise üretim sürecinde peynir altı suyu tamamen ayrılır ve teleme haşlanarak şekillendirilir. Bu işlem sayesinde kaşar peyniri daha sert ve yoğun bir yapı kazanır. Beyaz peynir altı suyu daha az asidik ve tatlı peynir altı suyu olarak sınıflandırılır. Beyaz peynir üretiminde peynir altı suyu tamamen ayrılmadığından, peynir altı suyunda bulunan proteinler (özellikle whey proteinleri) daha az denatüre olur. Bu nedenle beyaz peynir altı suyu daha yüksek biyolojik değere sahiptir. Kaşar peynir üretiminde peynir altı suyu tamamen ayrılır ve teleme haşlanarak şekillendirilir. Bu işlem sırasında whey proteinleri daha fazla denatüre olur. Bu durum kaşar peynir altı suyunun yapısının daha fazla değişmesine ve biyolojik değerinin bir miktar düşmesine yol açabilir. Bu farklılıklar peynir altı suyunun kullanım alanlarını ve besin değerlerini etkileyebilir (Garg vd., 2021).

### **2.3.8. Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Diğer Maddelerle Etkileşimleri ve Stabilitesi**

Beyaz peynir ve kaşar peynir altı suyu proteinlerinin diğer maddelerle etkileşimi ve stabilitesi, üretim süreçlerindeki farklılıklar nedeniyle değişiklik gösterebilir; beyaz peynir altı suyu proteinleri daha az denatüre oldukları için daha yüksek biyolojik değere sahiptir. Bu proteinler, emülsifikasyon, jel oluşturma ve su tutma kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bu özellikler, gıda ürünlerinde kıvam arttırma ve stabilite sağlama açısından önemlidir.

Kaşar peynir altı suyu proteinleri, üretim sürecinde daha fazla denatüre olur. Bu proteinler, beyaz peynir altı suyu proteinlerine göre daha az fonksiyonel olabilir, ancak yine de emülsifikasyon ve jel oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu özellikler, gıda sanayisinde kullanıldığında önem arz eder (Dullius vd., 2018).

### **2.4. Biyoaktif Peptitler**

Biyoaktif peptitler, tüketildiğinde fizyolojik faydalar sağlayan, yaklaşık 2-20 amino asit uzunluğundaki kısa dizilerdir. Ana proteinlerin dizisinde aktif değildirler ve uygun yöntemler ile proteinlerden salınabilirler. Biyoaktif peptitler bağırsakta emilebilir ve doğrudan kan akışına girebilir, bu da onların biyoyararlılığını ve hedef bölgede fizyolojik etkinliğini sağlar (Li ve Yu, 2015).

Bir diyet bileşenin 'biyoaktif' olarak kabul edilebilmesi için, fizyolojik açıdan gerçekçi bir düzeyde ölçülebilir bir biyolojik etki sağlaması gerekir. Ölçülen biyoaktivitenin (en azından) sağlığı faydalı bir şekilde etkileme potansiyeline sahip olması gerekir. Dolayısıyla potansiyel olarak zararlı etkiler (toksikite, alerjenite ve mutajenite gibi, ki bunlar şüphesiz 'biyoaktivitenin' tanımındaki bir yansımasıdır) bu tanımın dışında bırakılmalıdır.

Biyoaktif proteinler ve peptitler için *in vitro* ve hayvan deneylerinden sonra immünomodülatör, antihipertansif, osteoprotektif, antilipemik, opiat, antioksidatif ve antimikrobiyal gibi çok sayıda etki tanımlanmıştır (Möller vd., 2008).

Mevcut bilgilere göre, büyükbaş hayvan sütü, peynir ve süt ürünleri, gıdalardan elde edilen biyoaktif protein ve peptitlerin açık ara en büyük kaynakları gibi görünmektedir.

Ancak biyoaktif peptitler ve proteinler diğer hayvan ve bitki kaynaklarından da elde edilir. Sığır kanında, jelatin, et, yumurta ve ton balığı, sardalya, ringa balığı ve somon gibi çeşitli balık türlerinin yanı sıra buğday, mısır, soya, ayçiçeği çekirdeği, pirinç, mantar, kabak ve sorgumda biyoaktif proteinler doğrudan tespit edilmiş veya hidrolizasyon veya fermantasyon ile salındıktan sonra tespit edilmiştir (Möller vd., 2008).

Biyoaktif peptitler, protein içeren gıdaların işlenmesi veya sindirimi sırasında oluşabilir. Ayrıca gıda proteinlerinin *in vitro* parçalanmasıyla da biyoaktif peptitler üretilir (Gülseren ve Çakır, 2019). Sindirim sırasında oluşan bu peptitler sağlık açısından önemlidir. Biyoaktif peptitler sentetik ilaç molekülleri kadar güçlü olmasa da belirgin yan etkileri olmaması nedeniyle fonksiyonel gıdalarda kullanılabilir (Gülseren ve Çakır, 2019) ve faydalı etkileri oldukça çeşitlidir. Bunlar arasında antioksidan, antihipertansif, antidiyabetik, antikarsinojenik, antimikrobiyal ve immünomodülatör aktiviteler bulunabilmektedir (Gülseren ve Çakır, 2019; Li ve Yu, 2015).

Biyoaktif peptitler, tüm bağırsak boyunca gıda proteinlerinden serbest bırakılabilir ve ince ve kalın bağırsakta biyoaktivite gösterebilirler (Möller vd., 2008).

Bilinen biyoaktif peptitlerin çoğu bağırsak kanalında emilmez. Bu nedenle birçok protein ve peptit ya doğrudan bağırsak kanalında ya da bağırsaktaki reseptörler ve hücre sinyalleri yoluyla etki edebilir (Möller vd., 2008).

### **2.4.1. Biyoaktif Peptitlerin Tanımlanması ve Karakterizasyonu**

Biyoaktif peptitlerin tanımlanması ve karakterizasyon süreci; elde edilmesi, saflaştırılması, tanımlanma ve karakterizasyon aşamalarından oluşur. Elde edilmesi; hidroliz, proteinler, enzimler veya fermantasyon kullanılarak küçük parçalara ayrılır. Yeni teknolojiler; ultrasonikasyon ve yüksek basınç gibi modern yöntemlerde kullanılabilir. Saflaştırma; membran filtrasyonu, peptitler moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. Kromatografi yöntemleri, HPLC gibi yöntemlerle proteinler daha saf hâle getirilir. Tanımlama ve karakterizasyon; kütle spektrometresi, peptitlerin amino asit dizilerini belirler. Biyoinformatik araçlar; peptitlerin biyolojik aktivitelerini tahmin etmek ve analiz etmek için kullanılır. Bu adımlar, biyoaktif peptitlerin sağlık üzerindeki etkilerini ve potansiyel kullanım alanlarını belirlemek için önemlidir (Mojica vd., 2017).

#### **2.4.1.1. Antihipertansif Peptitler**

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan risk faktörlerinden biridir (Göksu vd., 2022). Hipertansiyon, dinlenme durumunda arteriyel sistolik ve/veya diyastolik kan basıncının yükselmesi ( $\geq$  140/90 mmHg) olarak tanımlanır. Günümüzde hipertansif hastalıklar insan sağlığını ciddi anlamda tehdit etmektedir. Hipertansiyonun dünya çapında ortalama yaygınlığı %15 civarındadır (Li ve Yu, 2015).

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE), membrana bağlı bir çinko metalloproteazıdır ve glikozidik bağlar içerir. ACE, kan basıncını, su ve tuz dengesini belirleyen renin-anjiyotensin sisteminde kritik bir role sahiptir. Bu enzim, anjiyotensin I hormonunu, bir damar daraltıcı (vazokonstriktör) bir hormon olan anjiyotensin II hormonuna dönüştürür ve ayrıca; damar genişletici (vazodilatör) bir peptit olan bradikinini de hidroliz ederek yıkar, böylece peptidin damar genişletici fonksiyonunu engeller. Bu şekilde, ACE, tansiyonu yükseltir ve kandaki sıvı ve tuz dengesini ayarlar (Çağlar, 2019). Bu iki etki nedeniyle, ACE, insanlarda kan basıncını artırma potansiyeline sahiptir (Coşkun vd., 2019; Gülseren ve Çakır, 2019).

Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE; peptidildipeptid hidrolaz, EC 3.4.15.1) kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Renin-anjiyotensin sistemi içinde ACE, anjiyotensin I'den, vazokonstriksiyona ve ardından kan basıncında artışa neden

olan bir hormon olan anjiyotensin II'ye dönüşümü katalize eder. Ayrıca ACE, vazodilatör özelliklere sahip olan bradikinini de parçalar. Böylece ACE inhibitörleri hipertansiyonu düşürür ve kardiyovasküler hastalıkları önlediğine inanılır (Möller vd., 2008).

Hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların klinik tedavisinde sentetik anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri de dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu sentetik ilaçlar ishal, alerji, deri döküntüleri, böbrek fonksiyon bozukluğu ve bazen de hipotansiyon gibi çeşitli yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu yüzden doğal ve güvenli ACE inhibitörlerinin araştırılması kritik bir araştırma alanıdır. (Göksu vd., 2022). ACE-inhibitör peptitleri, sentetik ilaç moleküllerinin belirgin yan etkilerini göstermeden kan basıncını ve hipertansiyon azaltma yeteneğine sahiptir (Coşkun vd., 2019; Gülseren ve Çakır, 2019).

Örneğin antihipertansif etki gösterebilmek için peptitlerin bağırsaktan emilmesi ve önemli konsantrasyonlarda kan damarlarındaki hedef hücrelere ulaşması gerekir (Möller vd., 2008).

Gıdalarda bulunan ACE inhibitör peptitlerinin araştırılması çok aktif bir araştırma alanı olmasına rağmen, peptit dizileri ve biyolojik aktivite ile ilgili bilgi içeren az veri tabanı mevcuttur (Alcaide-Hidalgo vd., 2020).

#### **2.4.1.2. Antidiyabetik Peptitler**

Tip 2 diyabet (T2D), dünyada 347 milyondan fazla kişiyi etkileyen ve iki ana diyabet türünün %90'ını oluşturan edinsel ve çok faktörlü sağlık sorunlarının özelliklerini taşıyan bir durumdur (Amaya-Farfan vd., 2016).

Dolaşım sistemi hastalıklarının risk faktörleri arasında hipertansiyon ve diyabet tedavisinde kullanılan ACE ve DPP 4 inhibitörleri önemli bir yer tutmaktadır (Çağlar, 2019).

#### **2.4.1.3. Covid 19 Önleyici Aktivite**

Biyoaktif peptitlerin Covid-19 önleyici aktivite gösterebilir. Antiviral etkinliği sayesinde, biyoaktif peptitler, virüslerin hücrelere girmesini engelleyebilir veya virüslerin çoğalmasını durdurabilir.

Biyoaktif peptitler, bağışıklık sistemini destekler, güçlendirir ve vücudun virüslere karşı daha etkili bir savunma yapmasına yardımcı olabilir. Anti-inflamatuar özellik açısından biyoaktif peptitler, inflamasyonu azaltarak covid-19'un neden olduğu aşırı bağışıklık tepkilerini hafifletebilir. Bu özellikler, biyoaktif peptitlerin covid-19'a karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Ahvanooei vd., 2022).

#### **2.4.2. Biyoaktif Peptit Üretimi, Konsantre Edilmesi ve Saflaştırılması**

Bazı ürünlerin endüstriyel uygulamalara geçişinde ve gıda alanında uygulamalarda hala eksiklikler söz konusu olsa da halihazırda birçok tescillenmiş biyoaktif peptit piyasalarda satılmaktadır. Özellikle protein bakımından zengin atık veya işleme yan ürünlerinin bu şekilde işlenerek sağlık üzerine olumlu etkileri olan, katma değerli yeni ürünlerin üretimi ülke ekonomisine de katkı sağlayacaktır. Ayrıca fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesinde biyoaktif peptitlerin kullanımına yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç vardır (Palamutoğlu ve Kasnak, 2018).

Bugüne dek, farklı gıda matrislerine dahil edildiklerinde protein hidrolizatlarının biyoaktivitesi, özellikle de olası antidiyabetik aktivitesi üzerindeki etkisi hakkında, rutin olarak kullanılan endüstriyel işleme ve depolama koşulları ile ilgili bilgiler sınırlıdır. (Harnedy-Rothwell vd., 2021)

#### **2.4.3. Biyoaktif Peptitlerin Biyolojik Fonksiyonelliklerinin İncelenmesi**

Peptitlerin elde edilmesinde enzimatik hidroliz işleminden yararlanır. Proteinler, enzimler yardımıyla küçük peptitlere ayrılır. Fermentasyon işleminde mikroorganizmalar kullanılarak proteinler parçalanır ve biyoaktif peptitler elde edilir. Saflaştırma ve tanımlamada, kromatografik yöntemler kullanılır. Peptitler, HPLC gibi yöntemlerle saflaştırılır. Kütle spektrometresi; peptitlerin amino asit dizileri belirlenir. Biyolojik aktivite testi olan, *in vitro* testlerle, hücre kültürlerinde peptitlerin biyolojik aktiviteleri (örneğin; antioksidan, anti-inflamatuar) test edilir. *İn-vivo* testler, hayvan

modellerinde peptitlerin biyolojik etkileri incelenir. Biyoyararlanım ve stabilite; sindirim simülasyonları, peptitlerin sindirim sisteminde nasıl davrandığı ve ne kadarının emildiği incelenir. Stabilite testleri; peptitlerin farklı koşullarda (örneğin, pH, sıcaklık) ne kadar stabil olduğu test edilir. Bu aşamalar, biyoaktif peptitlerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini ve endüstriyel uygulamalarını belirlemek için önemlidir (Lestringant vd., 2014).

#### **2.4.4. Biyoaktif Peptitlerin Endüstriyel Uygulamalarda Kullanımı**

Biyoaktif peptitlerin endüstriyel uygulamalarda çeşitli kullanım alanları mevcuttur. Başlıca kullanım alanları gıda, ilaç, kozmetik endüstrisi ve hayvan yemleridir. Gıda endüstrisinde, fonksiyonel gıda üretimi için biyoaktif peptitler, gıdalara eklenerek besin değerini artırır ve sağlık açısından yarar sağlar. Örneğin, antioksidan, anti-inflamatuar ve kan basıncını düşürücü özelliklere sahip olabilirler. Gıda atıklarının değerlendirilmesinde, gıda üretiminde ortaya çıkan yan ürünlerden biyoaktif peptitler elde edilerek, bu atıklar ekonomik değere dönüştürülür (Gantumur vd., 2023).

Kozmetik endüstrisinde biyoaktif peptitler, cilt bakım ürünlerinde kullanılarak cilt yenilenmesini teşvik eder ve yaşlanma belirtilerini azaltır. İlaç endüstrisi, tedavi edici ürünler olarak kullanılabilen biyoaktif peptitler, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Örneğin; antimikrobiyal, antikanser ve bağışıklık sistemini düzenleyici özelliklere sahip olabilirler. Tarım ve hayvancılıkta ise biyoaktif peptitler, hayvan yemlerine eklenerek hayvan sağlığını ve büyüme performansını iyileştirebilir. Bu uygulamalar, biyoaktif peptitlerin çok yönlü ve değerli bileşenler olduğunu göstermektedir (Hartmann vd., 2007).

##### **2.4.4.1. Ekmek**

Ekmek, genel olarak biyoaktif bir ürün olarak kabul edilmez. Ancak ekmekte bulunan bazı bileşikler biyoaktif özellik gösterebilir. Örneğin tam buğday unu ile üretilen ekmekler daha fazla lif, vitamin ve mineral içerir. Bu bileşikler, sindirim sağlığına ve genel sağlık durumuna olumlu etkiler yapabilir. Ekşi mayalı gibi fermente ürünler ise probiyotik özellikler göstererek, bağırsak sağlığını destekleyebilir. İlgili çalışmada

probiyotik etki gösteren ekşi maya değil, probiyotik etki göstermeyen ve hızlı kabarma sağlayan instant maya kullanılmıştır.

Sade tuzsuz ekmeğe; un, su ve maya gibi basit bileşenlerden elde edilir. Un olarak genellikle buğday unu kullanılır. İlgili çalışmada da buğday unundan istifade edilmiştir. Buğday unu, protein (gluten) ve karbonhidrat açısından zengindir. Su, hamura kıvam verirken, maya; kabarmasını sağlar. Gluten; buğday ununda bulunan ana protein kaynağı olup hamura elastikiyet ve yapı kazandırır. Gluten, gliadin ve glutenin adlı iki proteinden oluşur. Buğday ununda az miktarda albümin ve globulin gibi diğer proteinler de bulunur. Bu proteinler su ile karışıtklarında hamurun yapısına katkıda bulunurlar. Sade ekmeğe protein açısından zengin olmamakla beraber, içerdiği gluten sayesinde hamurun yapısını ve dokusunu oluşturur (Cankurtaran vd., 2023).

#### **2.4.4.2. Yoğurt**

Yoğurdun yapısı ve bileşimi; yoğurt, sütün özel yoğurt kültürleriyle (*Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) fermente edilmesiyle oluşur.

İçeriğinde protein, yağ, karbonhidrat, vitaminler ve mineraller bulunur. 100 g yoğurtta yaklaşık 3.5 g protein, 3.3 g yağ ve 4.7 g karbonhidrat vardır.

Protein içeriği, kazein, yoğurttaki ana protein türüdür ve sütün toplam protein içeriğinin büyük bir kısmını oluşturur. Whey proteinleri;  $\alpha$ -laktalbümin ve  $\beta$ -laktoglobulin gibi proteinler de bulunur.

Biyoaktif Özellikler; fermantasyon süreci sayesinde yoğurt, biyoaktif peptitler içerir. Bu peptitler, bağışıklık sistemi, sindirim sistemi ve kalp sağlığı üzerinde olumlu etkiler yapabilir. Ayrıca, probiyotik bakteriler içerdiği için sindirim sağlığını destekleyerek bağışıklık sistemini güçlendiren hem besleyici hem de sağlık açısından faydalı bir gıdadır (Fiebig vd., 2024).

Probiyotik etki yoğurt, sindirim sistemini destekleyen ve bağırsak sağlığını iyileştiren canlı probiyotik bakteriler içerir. Bu bakteriler, sindirim yardımcıdır ve bağışıklık sistemini güçlendirir. Anti-inflamatuar özellikleri sayesinde yoğurttaki biyoaktif peptitler, vücutta inflamasyonu azaltabilir ve kronik hastalıkların riskini düşürebilir. Bağışıklık sistemi desteği; yoğurttaki probiyotikler ve biyoaktif bileşenler, bağışıklık

sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. Antioksidan etki; yoğurttaki bazı bileşenler, serbest radikallerle savaşarak hücre hasarını önleyebilir ve yaşlanma sürecini yavaşlatabilir. Kolesterol düzeylerini düzenlemesinde görev alırlar. Yoğurttaki probiyotikler, kolesterol seviyelerini düzenleyebilir ve kalp sağlığını destekleyebilir. Bu özellikler, yoğurdun düzenli tüketiminin genel sağlık üzerinde olumlu etkiler yapabileceğini gösterir (Fiebig vd., 2024).

Sütteki plazmin veya bakteriyel başlangıç kültürlerindeki enzimler de proteinleri bozabilir (Möller vd., 2008).

Buzdolabında saklama sırasında yoğurt numunelerinde ACE-I inhibitör aktivitesine sahip peptit profillerinin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Shori vd., 2022).

#### **2.4.4.3. Vegan Köfte**

Vegan köfteler protein alımı için bitkisel bir alternatiftir. İlgili çalışmada Veggy vegan köfte ürününden istifade edilmiştir. Veggy bezelyeli vegan köfte %46 oranında bezelye proteini, yulaf, galeta unu, kurutulmuş soğan, keten tohumu, pirinç unu, kurutulmuş bitki karışımı (pırasa, soğan domates, havuç kırmızı biber, yeşil biber), maya ekstraktı ve tuz içerir. Vegan köftenin protein kaynakları içeriğinde bulunan bezelye proteini, keten tohumu, yulaf ve galeta unundan gelmekte olup, ana protein kaynağı bezelye ve keten tohumudur. Bezelye proteini yüksek biyolojik değere sahiptir, esansiyel amino asitler açısından zengindir ve sindirimi yardımcıdır. Keten tohumu ekstra protein ve omega-3 yağ asitleri sağlar. Bu köfte yüksek proteinli vegan bir alternatiftir. Keten tohumu ve bezelye proteini gibi bitkisel protein kaynakları, çeşitli biyoaktif peptitler ve bileşenler içerebilir. Bu biyoaktif bileşenler, antioksidan, anti-inflamatuar ve bağışıklık sistemini destekleyici özelliklere sahip olabilir. Ancak, ürünün tam olarak biyoaktif olup olmadığını belirlemek için spesifik analizler ve araştırmalar yapılması gerekmektedir. Genel olarak, bitkisel protein kaynakları biyoaktif bileşenler açısından zengin olabilir (Zhang vd., 2023).

## **2.5. Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Çalışmaları**

Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim çalışmaları, laboratuvar ortamında insan sindirim sistemini taklit ederek yiyeceklerin nasıl sindirildiğini ve emildiğini incelemek için yapılır. Bu çalışmaların temel aşamaları sırası ile mekanik ve enzimatik parçalanma, simüle edilmiş sindirim ve emilimden meydana gelir.

Mekanik parçalanma esnasında yiyecekler, sindirim sisteminde olduğu gibi fiziksel olarak küçük parçalara ayrılır. Enzimatik parçalanma sırasında parçalanmış yiyecekler, sindirim enzimleri ile karıştırılarak daha küçük moleküllere ayrılır. Simüle edilmiş sindirimde, yiyecekler, mide ve bağırsak ortamını taklit eden sıvılarla karıştırılır. Bu sıvılar, mide asidi ve bağırsak enzimlerini içerir. Emilimde ise, parçalanmış besin maddeleri, ince bağırsak ortamını taklit eden bir sistemde emilir ve kana geçişi simüle edilir. (Brodkorb vd., 2019).

Bu çalışmalar, özellikle probiyotik gıdaların etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. Örneğin, fermente ürünlerdeki yararlı bakterilerin sindirim sonrası hayatta kalma oranları incelenir.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Soğuk pres yağı alınmış ay çekirdeği küspesi, laboratuvarlarımızda soğuk pres işleminden geçirilmiştir. Beyaz ve kaşar peynir altı suyu proteinleri (Şekil 3.2) ise, yerel bir firma olan Kaanlar Peynir (Tekirdağ), tarafından sağlanmıştır. Proses süresince soğuk pres ayçiçeği çekirdeklerinin numune sıcaklığı 40°C'nin altında tutulmuştur, (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1:** Yağı alınmış ayçiçeği posası

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



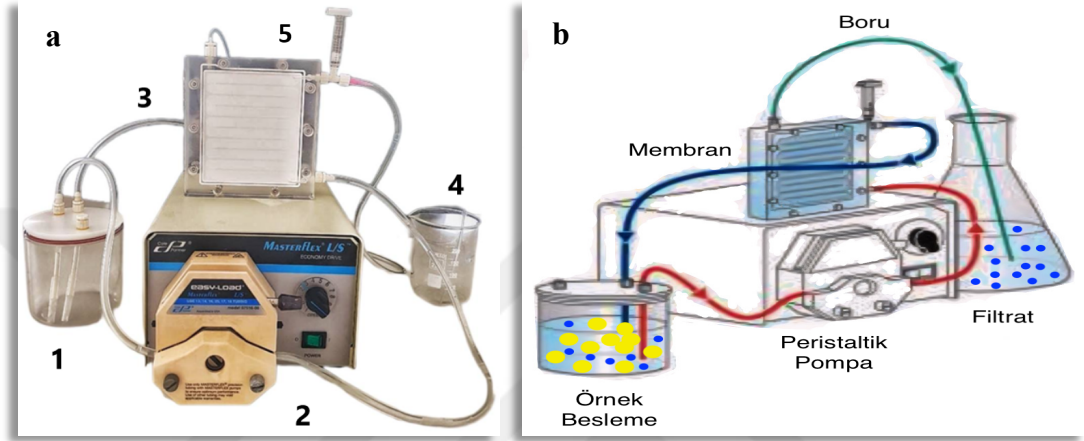
**Şekil 3.2:** Konsantre peynir altı suyu

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarf maddeleri; hidroklorik asit (320331-Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (S5881- SigmaAldrich), sodyum klorit (S9888-Sigma-Aldrich), sodyum fosfat monobazik monohidrat (71504-Sigma-Aldrich), sodyum fosfat dibazik dihidrat (04272- Sigma-Aldrich), sodyum asetat anhidrat (969.176, Isolab), asetik asit (27225- 2- Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS, 8170349020, Merck), pikriksülfonik asit solüsyonu (2,4,6-trinitrobenzen-sülfonik asit solüsyonu, TNBS, P2297- Sigma-Aldrich), L-Lösin (L8000- Sigma-Aldrich), hippürik asit (HA, 68069- Sigma-Aldrich), Hippüril-His-Leu (HHL, H1635- Sigma-Aldrich), borik asit (B6768- Sigma-Aldrich), metanol (1060072500, Merck), trifloroasetik asit (TFA, T6508- Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, D9132- Sigma-Aldrich), Kaptopril (PHR1307- Sigma-Aldrich), Gly-Pro-pNA (G0513- Sigma-Aldrich), Ile-Pro-Ile (Diprotin A, Sigma I9759- Sigma-Aldrich), Alkalaz (Novozymes), Flavorzim (Novozymes), sodyum azid (S2002- Sigma Aldrich), asetilkolin iyodür (A5751- Sigma-Aldrich), ACE (Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung, A6778- SigmaAldrich), DPP-IV (Dipeptidyl Peptidase IV human, D4943- Sigma-Aldrich), amonyum asetat, Folin- Ciocalteu, sodyum karbonat, BSA (P5619, Sigma-Aldrich Corp) olarak belirlenmiştir.

### 3.2. Kullanılan Teçhizat

Bu çalışmada, numunelerin protein fraksiyonlarının ayrıştırılması ve konsantrasyonunun artırılması amacıyla Şekil 3.3'te yer alan ultrafiltrasyon (UF) cihazı kullanılmıştır.



**Şekil 3.3:** UF (Ultrafiltrasyon) Cihazı; Ultrafiltrasyon için Sartorius Masterflex Ultrafiltrasyon Sistemi, membran olarak ise; 3-5 ve 10 kDa filtrasyon membranı (VF20P9, VF20P1, VF20P0, Sartorius Stedim Biotech, İspanya) Ultrafiltrasyon sistemi; peristaltik pompa, membran, numune kabı ve tubinglerden oluşmaktadır.

**Kaynak:** a) Şişman., 2023 b) Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

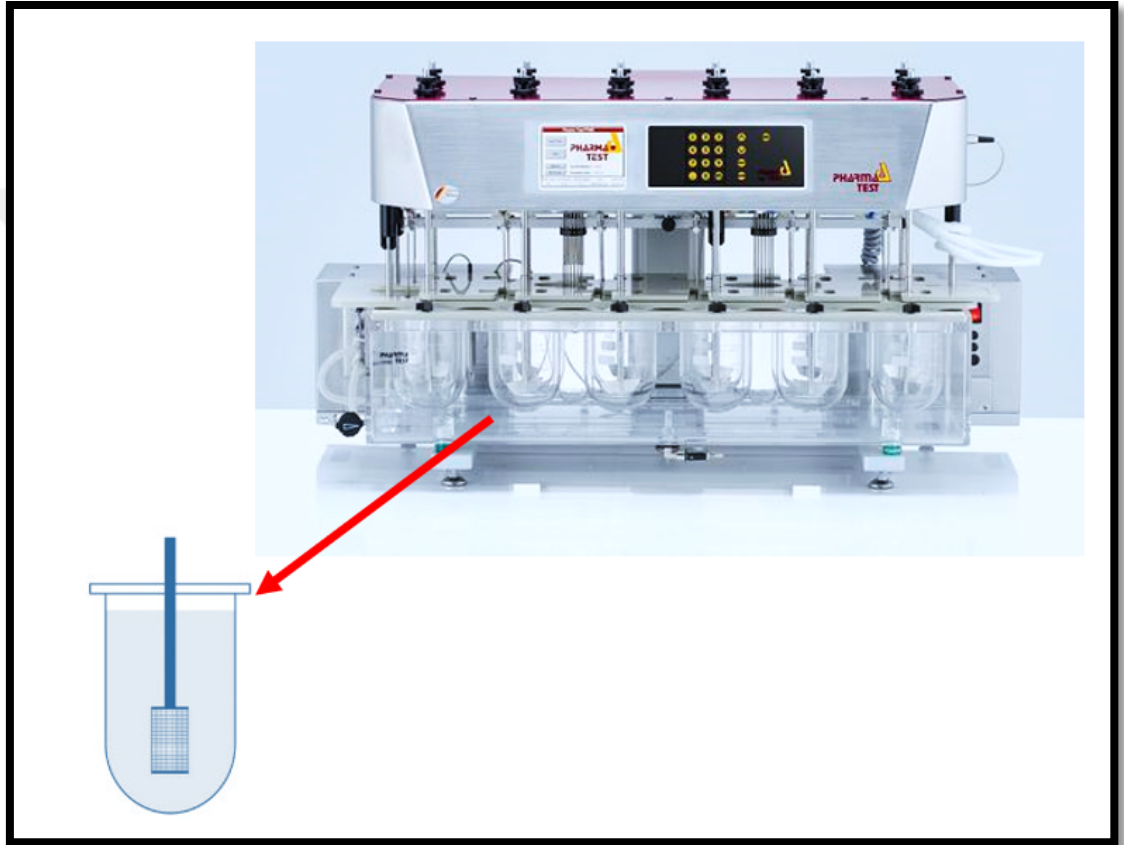
Örneklerin toplam azot içeriği ve dolaylı olarak protein miktarının belirlenmesinde Şekil 3.4'te yer alan yarı otomatik Kjeldahl distilasyon ünitesi kullanılmıştır.



**Şekil 3.4:** Distilasyon Cihazı- Velp- UDK 139 Yarı Otomatik Kjeldahl Distilasyon Ünitesi, azot protein tayin cihazı

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

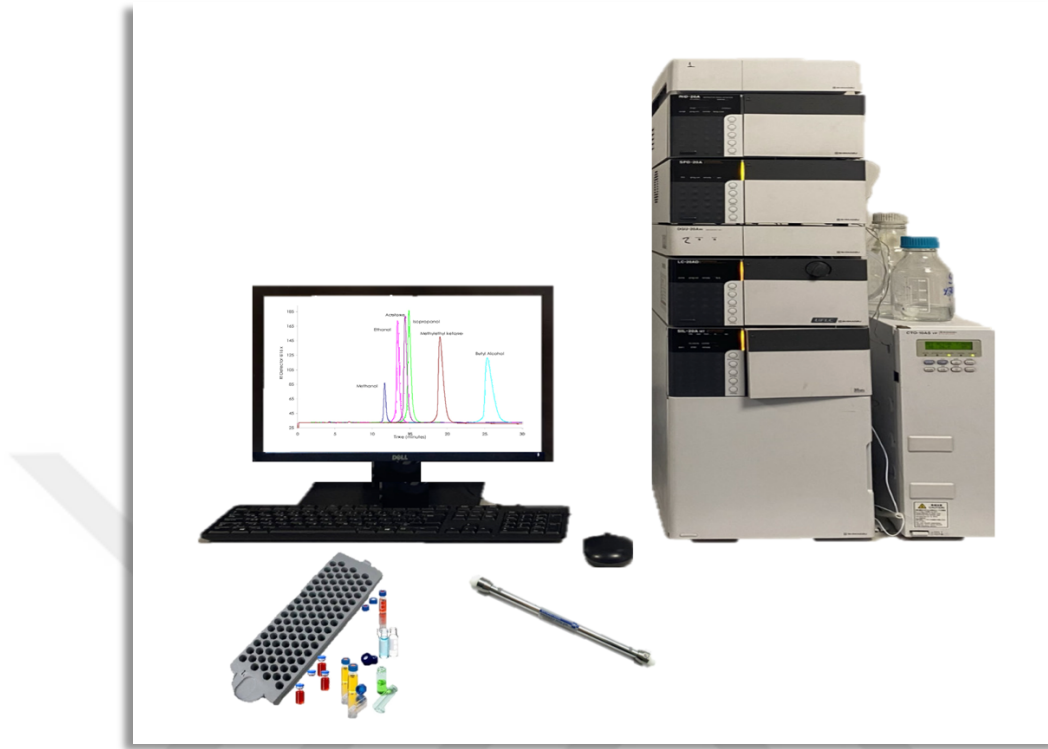
Biyoaktif bileşenlerin çözünürlüğünü, salınım hızını ve sindirilebilirliğini simüle etmek amacıyla Şekil 3.5'te gösterilen disolüsyon cihazından istifade edilmiştir. Hidrolizat içeren çeşitli gıda ürünlerinin (ekmek, yoğurt, vegan köfte) mide ve bağırsakta nasıl çözüldüğünü analiz eder. Biyoaktif peptitlerin kontrollü salım profilini değerlendirirken, fonksiyonel gıdaların en iyi formülasyonunu belirler ve biyoyararlanımı ölçer.



**Şekil 3.5:** Laboratuvar tipi disolüsyon cihazı ve USP-2 uyumlu aparatı. *In vitro* sindirim simülasyonu için laboratuvar tipi disolüsyon cihazından istifade edilmiştir.

**Kaynak:** Şişman, 2023

%ACE inhibisyon tayininde Şekil 3.6'da yer alan (yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı) HPLC sistemlerinden faydalanılmıştır.



**Şekil 3.6:** Prominence LC-20A HPLC sistemi (High performance liquid chromatography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) cihazı (Shimadzu Corporation, Japonya). HPLC sistemleri; verilerin toplanması için bilgisayar, dedektör, HPLC kolonu, kolon fırını, atık, enjektör, pompa ve çözücüden oluşmaktadır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Örneklerin (AP, API, APH, BP, BP 1:5, BP 1:30, KP, KP 1:5, KP 1:30) toplam azot miktarının belirlenmesinde Kjeldahl analiz yönteminden istifade edilmiş. Şekil 3.7'de verilen infrared yakma sistemi içerisinde bulunan yüksek performanslı ısıtıcılar vasıtasıyla örnekleri hızlı bir şekilde yüksek sıcaklıklara çıkararak, kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi sağlanır. Bu sayede örneklerin azot miktarı hızlı ve etkili bir şekilde tespit edilebilir. Sıcaklık sülfirik asidin kaynama sıcaklığına göre ayarlanır.

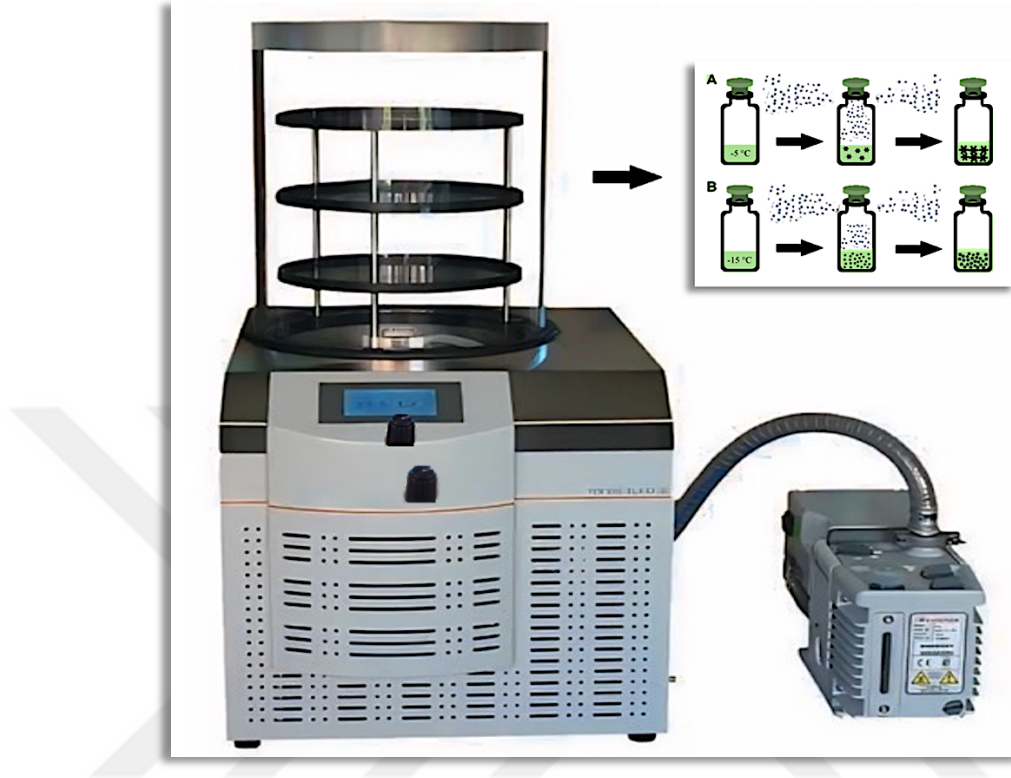
(AP; ayçiçeği çekirdeği, API; ayçiçeği protein izolatu, APH; ayçiçeği protein hidrolizatu, BP; beyaz peynir altı suyu, BP 1:5; 5 kat konsantre beyaz peynir altı suyu, BP 1:30; 30 kat konsantre beyaz peynir altı suyu, KP; kaşar peynir altı suyu, KP 1:5; 5 kat konsantre kaşar peynir altı suyu, KP 1:30; 30 kat konsantre kaşar peynir altı suyu).



**Şekil 3.7:** InKjel 625 M İnfrared Yakma Sistemi, Behr Labor Technik. İnfrared yakma sistemi; yüksek performanslı infrared ısıtıcı (homojen ısı dağılımı sağlar), manuel enerji ayarı, kuvars kızılötesi radyatörler (1500W) ve cam sindirim kapları, kademeli raf sistemi, duman giderme ünitesi ve yerleştirme rafından oluşmaktadır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Numunelerin kurutulması ve stabilitesinin artırılması amacıyla liyofilizatör cihazıyla (Şekil 3.8) dondurarak kurutma işlemi uygulanmıştır.



**Şekil 3.8:** Liyofilizatör; Teknosem TRS 2/2 V dondurucu kurutucu (Teknosem A.Ş., İstanbul, Türkiye). Hazırlanan ısıya duyarlı ayçiçeği izolatlarının korunması ve uzun süreli muhafazası için  $-20^{\circ}\text{C}$  da dondurulduktan sonra liyofilizatöre verilir. Dondurma işleminin ardından süblimasyon yoluyla düşük sıcaklık ve basınç altında izolat sularının uzaklaştırılarak liyofilize edilmesi, kurutulması işleminde liyofilizatör cihazından istifade edilmiştir. Liyofilizatör; vakum odacığı, manifoldlu paslanmaz çelik vakum kulesi, vakum hattı, kondanser, kondanser odacığı ve soğutma ünitesinden oluşmaktadır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ayçiçeği, beyaz ve kaşar peynir altı suyu protein izolatları ve hidrolizatlarının hazırlanmasında Şekil 3.9’da verilen santrifüj cihazından istifade edilmiştir.



**Şekil 3.9:** Santrifüj Cihazı; Hitachi Santrifüj -CR22N- N62567 (Japonya). Santrifüj işlemi, yüksek devirde dönme hareketi ve soğutma özelliği sayesinde yoğunluk farkından yararlanılarak faz ayrışımının sağlanması prensibine dayanır. Santrifüj cihazı merkez kaç kuvveti etkisi ile dönerken ağır ve yoğun maddeler dışa (tüpün alt kısmına doğru) itilirken, hafif maddeler merkeze yakın konumda (tüpün üst kısmında) birikir. Dipte kalan kısım katı kısım pellet olarak isimlendirilirken, üste çıkan sıvı kısım süpernatant olarak adlandırılır. Santrifüj; rotor (örneklerin yerleştirildiği döner parça), rotor odası (rotorun yerleştirildiği alan, odacık), alarm sistemi (teknik bir aksaklık anında devreye girer), renkli dokunmatik ekran, kapı kilit mekanizması ve -10°C ile 40°C bandında, 22.000x g hıza kadar çıkma olanağı sunan yüksek performanslı bir cihazdır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Numunelerin absorbans değerlerini ölçmek ve bileşen analizlerini gerçekleştirmek amacıyla Şekil 3.10’da yer alan spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.



**Şekil 3.10:** Spektrofotometre Cihazı; UV-VIS Spektrofotometre Cihazı UV-1280 - A12065402194 (SP- 3000 nano, Optima, Japonya)

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ekmek, yoğurt ve vegan köfte ürünleri Tris buffer (tampon çözeltisi) ilavesi ile 2 dk boyunca yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör (Şekil 3.11) vasıtasıyla homojenize edildi.



**Şekil 3.11:** T 18 Digital Ultra-Turrax, Shear Mixer; Yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör (0003720000). Yüksek devirli karıştırıcı, sıvı numuneleri homojen hale getirerek dağıtırken, paslanmaz çelik tak-çıkart başlıkları vasıtasıyla, hızlı ve pratik temizleme imkânı sunar ve dijital hız göstergesi ile ayarlanabilir geniş hız aralığı (3000-25.000 rpm), farklı uygulamalara uygun çalışma imkânı sunar.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ultrasonik banyo ile gaz uzaklaştırma işlemi, analiz güvenliğini artırır ve verimli sonuçlar elde etmek için önemlidir. Bu amaçla mobil fazların hazırlanmasında Şekil 3.12’de yer alan ultrasonik banyo cihazından istifade edilmiştir.



**Şekil 3.12:** Ultrasonik Banyo ve Isıtma; JP Selecta Ultrasons-HD, 22L 559528 E-115-EBL, Ultrasonik banyo vasıtası ile mobil faz içerisinde biriken gazların uzaklaştırılması; Ultrasonik banyo, yüksek frekanstaki ses dalgalarının sıvı içinde ve ayarlanabilir ısıda oluşturduğu basınç değişimleriyle temizlik, çözünme ve dispersiyon gibi işlemlerin gerçekleştirildiği bir temizleme yöntemidir. Ancak degassing (gaz giderme) işlemi, ultrasonik banyolarda özellikle önemlidir. Bu işlem, mobil faz içerisindeki gazları uzaklaştırarak analiz sistemlerinde güvenilir sonuçlar elde etmeyi amaçlar. Hava kabarcıkları, özellikle HPLC sistemlerinde, tüplerde ve pompa başlıklarında birikir ve bu kabarcıkların etkisi sistem basınç dalgalanmalarına yol açabilir.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Numunelerin doğru miktarda tartılması için Şekil 3.13’te yer alan hassas terazi, pH değerlerinin belirlenmesi için ise Şekil 3.14’te yer alan pH metre kullanılmıştır.



**Şekil 3.13:** Hassas Terazi, Radwag Wagl Elektroniczne AS 220.R2 448864 (Polonya)

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.14:** Hanna – HI 2211 Masa Tipi pH Metre

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.2.1. Ultrafiltrasyon (UF) Membranları

Bu çalışmada membran sistemleri fraksiyonlama işlemleri için kullanılmıştır. Bu bağlamda 3-5 ve 10 kDa MWCO (moleküler kütle kesme) membranlardan (VF20P9, VF20P1, VF20P0, Sartorius Stedim Biotech, İspanya) yararlanılmıştır. Ultrafiltrasyon sistemi; peristaltik pompa, membran, numune kabı ve tubinglerden oluşmaktadır.

Ultrafiltrasyon ile fraksiyonlama, sıvıların basınç yardımıyla membran üzerinden geçirilerek büyük moleküllerin ayrıştırılması işlemidir. Bu süreçte, işlem yapılacak sıvı uygun kaba alınarak yarı geçirgen bir membran üzerinden geçirilir. Membran, belirli bir büyüklüğün altındaki moleküllerin geçmesine izin verirken, büyük molekülleri tutar. Membranı geçen küçük moleküller permeat adı verilen kısımda toplanır, büyük moleküller ise membran üzerinde kalır ve retentat olarak adlandırılır. Retentat kısmı, istenilen saflığa ulaşana kadar yıkanabilir ve yoğunlaştırılabilir. Bu yöntem, proteinlerin saflaştırılması, enzimlerin yoğunlaştırılması ve atık su arıtımı gibi birçok alanda kullanılır (Cheryan, 1998).

### 3.2.2. Kjeldahl Yöntemi

Örnekler vortex yardımı ile 1 g tartılarak homojen hâle getirildi, ardından Kjeldahl tableti; 25 ml sülfürik asit ile yakma kabına aktarıldı ve yağ yakma metodu ile örnekler 1 saat boyunca yakıldı. Kjeldahl balonu, karışım açık sarı-yeşil renge dönene kadar düşük sıcaklıkta ısıtıldı. Bu sayede organik maddelerin azotu amonyum  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iyonu haline dönüştürüldü. Elde edilen amonyum azotu kuvvetli bir alkali ortam olan NaOH çözeltisi ile damıtılarak amonyak gazı açığa çıkarıldı. Amonyak gazı hidroklorik asit (0.1 M HCl) içinde tutuldu ve titrasyon ile miktarı belirlendi. Hidroklorik asit, amonyağı amonyum klorür ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) olarak hapsederek tuz haline getirildi. Titrasyon sonucu hesaplanan azot miktarı, 6.25 katsayısı ile çarpılarak değerler kaydedildi (AOAC International, 2019).

### 3.2.3. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

Kütle spektrometrisi (MS), bir numunenin bileşenlerini kütle ve elektrik yüklerine göre ayırmak için kullanılmıştır.

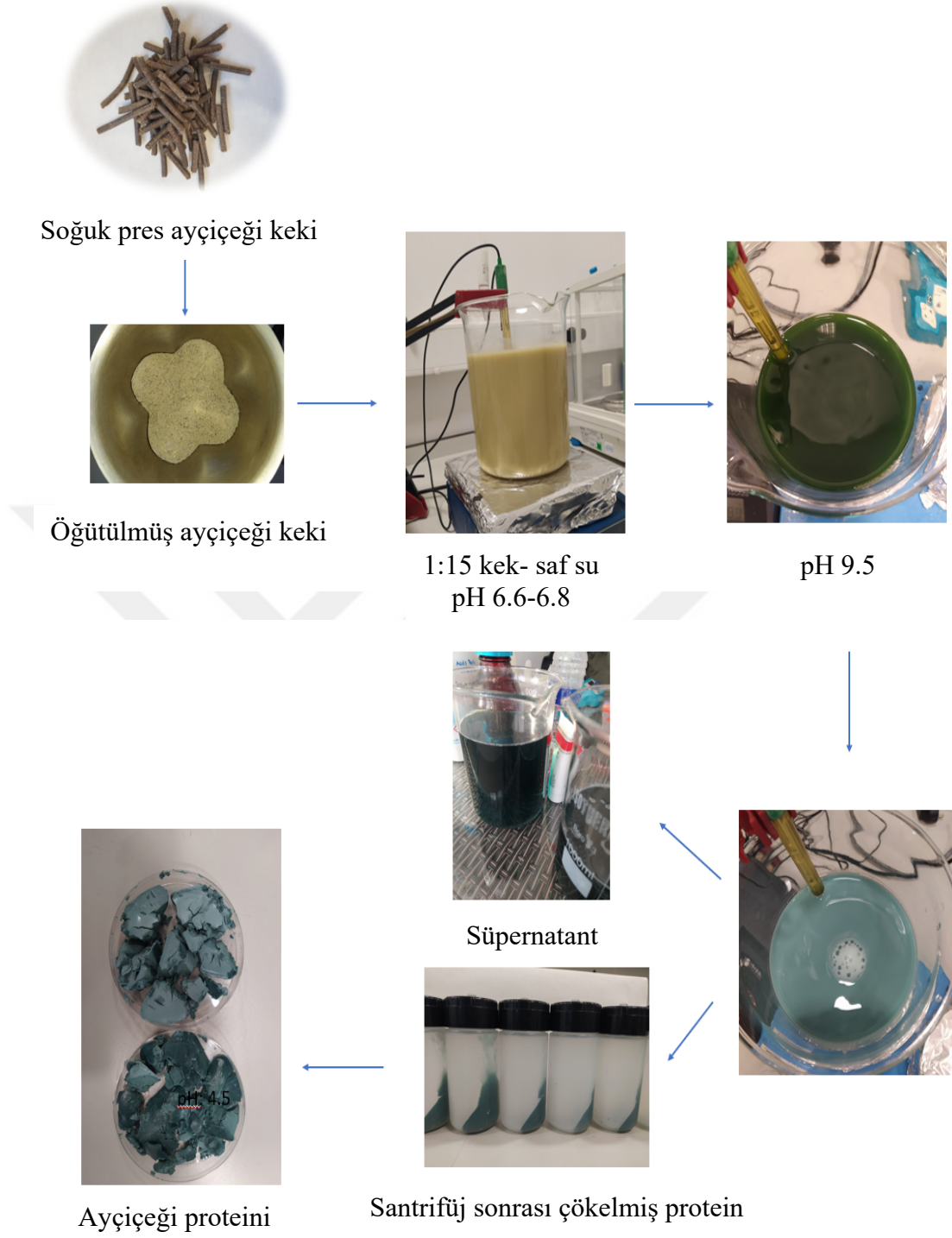
### **3.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

Proteinlerin ayrıştırılması, yapılarının tanımlanması, karakterizasyonu ve ölçümünde HPLC cihazından istifade edilmiştir.

### **3.3. Analiz Yöntemleri**

#### **3.3.1. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Konsantrelerinin Eldesi**

Ayçiçeği numuneleri laboratuvarlarımızda soğuk pres işleminden geçirilmiştir. Ayçiçeği soğuk pres kekinden protein elde etmek için, Göksu vd. (2022)'nin alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) metodu güncellenerek uygulandı ve ardından liyofilizasyon işlemiyle kurutulmuş formda ay çekirdeği protein izolatu (Şekil 3.15'te) gösterildi. Protein izolatu elde etmek için öncelikle yağı uzaklaştırılmış ayçiçeği küspeleri 1:15 oranında saf su ile dispers hale gelinceye kadar karıştırıldı. Ardından ortamın pH değeri 1 N NaOH çözeltisi ile pH 9.5'e ayarlandı ve oda sıcaklığında 500 rpm 'de 1 saat boyunca karıştırıldı. Bu sayede proteinlerin çözünmesini sağlanmaktadır. Bir saat sonunda karışım yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (Himac CR22N, Hitachi, Japonya) ile 20°C'de 10.000xg'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Çözünmüş protein içeren süpernatant (sıvı kısım) filtre kağıdıyla süzüldü ve süzülen sıvı bir beherde toplanarak 1 N HCl çözeltisi ile ortamın pH değeri 4.5'e ayarlandı. Bu işlem ise proteinlerin çöktürülmesi amacıyla gerçekleştirildi. Hemen ardından, proteinlerin ayrımını tamamlamak için tekrar yüksek hızlı soğutmalı santrifüj ile 20°C ve 10.000xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı kısım süzüldü ve çökelen pellet spatül yardımıyla toplandı. İşlem sonucu elde edilen proteinler kurutulmak üzere, petri kaplarına ince bir tabaka halinde yayılarak -20°C'de donduruldu. Ardından donmuş numunelerden liyofilizasyon işlemiyle ayçiçeği protein izolatu (Şekil: 3.2) gösterildi. Kurutulmuş protein izolatları ise sonraki aşamalarda kullanılmak üzere toz formda -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ayçiçeği soğuk pres kekinden (Şekil 3.1) gösterilen protein izolatının üretim aşamaları (Şekil 3.15) akış şeması halinde verilmiştir.



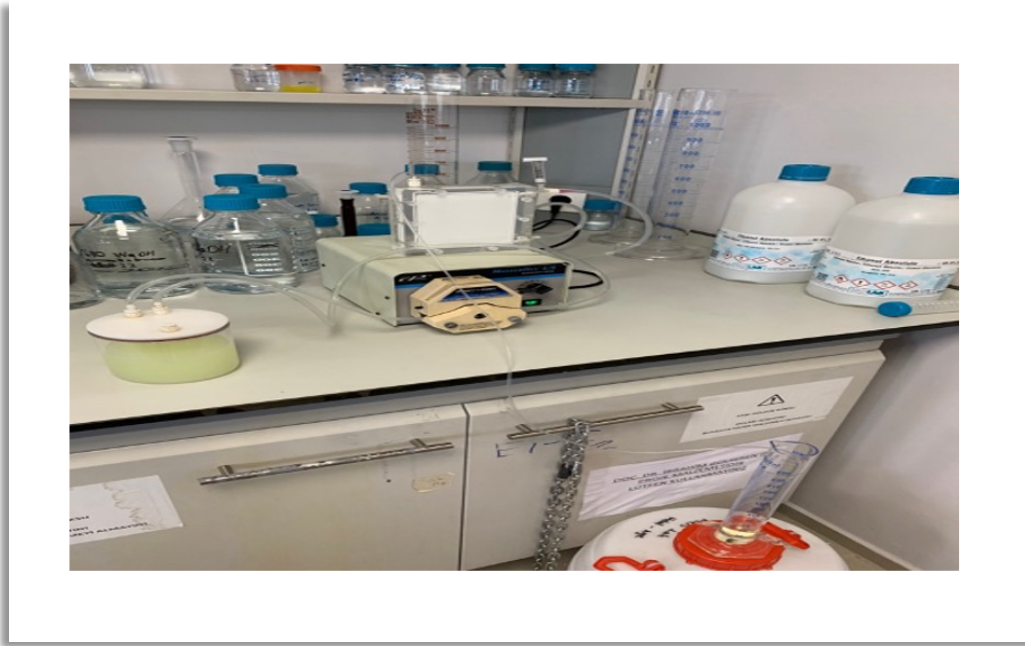
**Şekil 3.15:** Ayçiçeği çekirdeği protein izolasyonu akış şeması.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.16:** Liyofilize edilmiş ayçiçeği protein izolatı

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.17:** Peynir altı suyu numunelerinin ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantrasyonu

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.3.2. Ayçiçeği, Beyaz veya Kaşar Peynir Altı Suyu Protein İzolatlarının Hidrolizi

Ay çekirdeği protein hidrolizatı üretiminde proteinleri parçalamak için, Alkalaz ve Flavorzim enzimleri kullanılmıştır. Enzimlerin kullanımına uygun prosedürler ile hidroliz koşulları sağlanmıştır.

Alkalaz enzimi bir endopeptidaz olup proteinleri C-terminalinden peptit bağlarını kopararak çalışmaktadır. Protein izolatlarının hidrolizi Zhang, Zhao ve Wang, (2020) yaptıkları çalışma kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. Alkalaz enzimi için dispersiyon 1:100 (enzim: protein) oranındadır. İzolat 1:10 oranında saf su ile karıştırılırken ortamın pH değeri 5N NaOH yardımı ile pH 8'e ayarlandı. Ardından bakteriyostatik olarak, litre başına 0.2 g sodyum azid (koruyucu) ilave edildi. Alkalaz 2.4 AU enzim aktivite ünitesine sahip ürün kullanılmıştır. Ön denemelerde, Alkalaz enzimi için süre (2 saat) sabit tutuldu. Bu dispersiyonun 50°C'de 120 dakika boyunca enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirildi.

Sonrasında ise hidroliz derecesini arttırmak amacıyla N terminalinden peptit bağını kopararak çalışan ve hem ekzo- hem de endopeptidaz olan Flavorzim kullanılmıştır. Flavorzim enzimi için dispersiyon 1:100 (enzim- protein) oranında olup, pH 6-7 arasındadır. Flavorzim 1000 au/g aktivite ünitesine sahiptir. Flavorzim için farklı süreler denenmiştir. Nihayetinde bu dispersiyonun 50°C'de 240 dakika boyunca enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu süreci tamamlayan hidrolizatlar, enzimatik hidroliz reaksiyonunu durdurmak için 95°C'de su banyosunda 5 dakika tutularak enzimin aktivasyonu sağlanmıştır. Ardından numuneler hızlıca buz banyosuna alınarak, ortam sıcaklığına (25°C) gelene kadar soğutulmuştur. Soğutulan hidrolizatlardan çözünmeyen parçacıkları uzaklaştırmak için karışım 10.000 xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Son olarak örnekler şırınga yardımı ile 0.45 µm PTFE filtreden geçirilerek sonraki aşamalar için hazır hale getirildi.



**Şekil 3.18:** Sırasıyla beyaz ve kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatları ve ayçiçeği proteini hidrolizat örnekleri

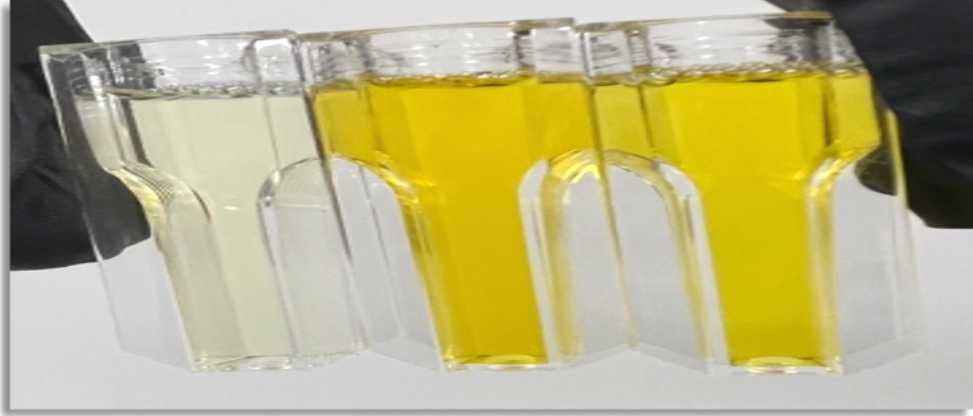
**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.3.3. Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi (%HD), Nem ve Kül Tayini

Protein hidrolizinde reaksiyonun izlenebilirliği açısından ana parametre hidroliz derecesidir (“degree of hydrolysis”, %DH). %DH, kırılmış peptit bağlarının yüzdesi olarak tanımlanır (Rutherford, 2010).

TNBS (2,4,6-Trinitrobenzen Sülfonik Asit) yöntemi ile hidroliz derecesi (%DH) değerinin belirlenmesi; Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi, gıda protein hidrolizatlarının proteolizi esnasında hidroliz derecesi (%DH) değerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir metot olup, doğru, tekrarlanabilir ve genel olarak uygulanabilir olması sebebiyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Hidrolizatların hidroliz dereceleri TNBS yöntemi (Adler-Nissen, 1979) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.19). TNBS ile serbest amino asit grupları arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Reaksiyon sonucu ölçülen rengin yoğunluğu veya absorbans değeri çözültide bulunan serbest amino asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Adler-Nissen, 1979). Hidroliz derecesi analizine (TNBS) ait görseller (Şekil 3.18)’de verilmiştir. Hidroliz dereceleri incelendiğinde,

süre bakımından 4 saat Flavorzim uygulanmış örnekler devam eden süreç için uygun görülmüştür.



**Şekil 3.19:** Sırasıyla kaşar peynir altı suyu, ayçiçeği ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi analizi (TNBS) sırasında görselleri

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{top}} \times 100 \text{ ile hesaplanır.}$$

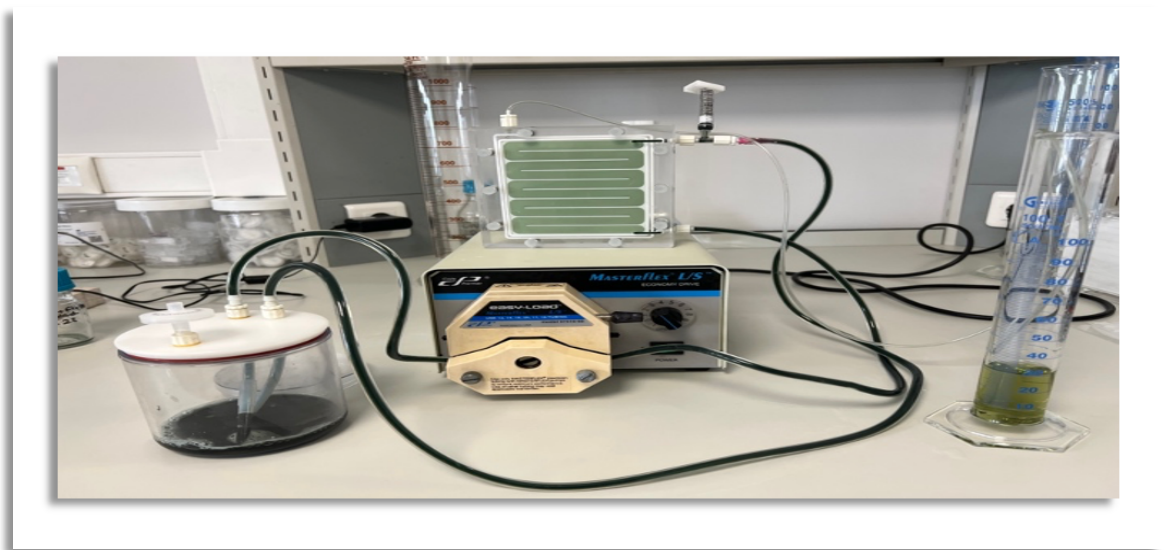
Burada  $h_{top}$ , protein eşdeğeri başına toplam peptit bağı sayısı ve  $h$ , hidrolize bağı sayısıdır.  $h_{top}$ , ham maddenin amino asit bileşimine bağlıdır. Hidroliz derecesi  $h$  ve  $h_{top}$  kullanılarak belirlenir (Rout vd., 2024).

Fraksiyonların hidroliz dereceleri  $\%DH > 50$  başarı kriterini bu aşamada sağlamıştır (Tablo 2).  $\%DH$  hidroliz derecesinin Alkalaz ve Flavorzim muamelelerinin ardından  $\%DH$ 'nin  $> 50$  olması amaçlanır. Endo ve ekzo proteazların kombine edilmesi proteiz derecesini iyileştirir. Alkalaz ve Flavorzim enzimleri kullanılarak hazırlanan hidrolizat numunelerin 1:10 seyreltildi. 40  $\mu$ l hidrolizat numunesi alındı ve üzeri 360  $\mu$ l (sodyum fosfat tamponu) ile tamamlandı. Elde edilen çözeltiliye 400  $\mu$ l, %0.44 (w/v) SDS çözeltilisinden (Sodyum Dodosil Sülfat) ilave edildi. Daha sonra sırası ile 190  $\mu$ l 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH 8.2) ve 300  $\mu$ l 0.1% (w/v) TNBS karışım ilave edilerek çözeltili vortekslendi. Reaksiyon su banyosunda 50°C'de 1 saatlik inkübasyon ile gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 1ml 0.1 N HCl kullanılarak reaksiyon

durduruldu. Örnekler, UV-Visible Spektrofotometre (SP-3000 nano, Optima Japonya) ile 340 nm dalga boyunda ölçüldü, absorbans değerleri kaydedildi. Kontrol grubu için, hidrolizat örnekleri yerine 0,2 M 190 µl sodyum fosfat tamponu (pH 8.2) kullanıldı Bu çalışmada Adler-Nissen, (1979) protokolü kısmen değiştirilerek uygulanmıştır.

### 3.3.4. Hidrolizatların Ultrafiltrasyon (UF) ile Fraksiyonlanması

Biyoaktif peptit içeren protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması amacıyla uygun ultrafiltrasyon (UF) yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ultrafiltrasyon için Sartorius Masterflex Ultrafiltrasyon Sistemi; pompa, membran, numune kabı ve tubinglerden (boru) oluşmaktadır (Şekil 3.3). Pompanın hızı membran basıncı 1.5 bar olacak şekilde ayarlanmıştır. Membran kaset olarak 3 kDa, 5 kDa ve 10 kDa (VF20P9, VF20P1 ve VF20P0, Sartorius Stedim Biotech, İspanya) MWCO membranlar kullanılmıştır. Dolayısıyla protein hidrolizatları Şekil 3.21’de verilen 3, 5 ve 10 kDa ultrafiltrasyon kasetlerinden geçirilerek 10 kat konsantre edilmiştir (Gassmann, 2010). Membrandan geçen kısım (filtrat), hacmen boyutu kaset boyutundan küçük olan molekülleri içeren kısımdır. Filtrasyon sonunda numune kabında kalan kısım ise moleküler boyutu kaset boyutundan büyük olan konsantre kısımdır. Bu kısım ayrıca toplandı ve muhafaza edildi. Liyofilizasyon işleminden sonra elde edilen numuneler biyoaktivite testlerinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi. Sonrasında elde edilen fraksiyonlara ait hidroliz dereceleri analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.4’te gösterilmiştir.



**Şekil 3.20:** Ultrafiltrasyon ile fraksiyonlama. Örnek olarak bir ayçiçeği protein hidrolizasyon numunesi incelenmektedir.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Bunun dışında ek bir değerlendirme olarak ay çekirdeği örneklerinin detaylı kompozisyonel analizi yürütülmüştür (Tablo 4.1) Elde edilen bir dizi fraksiyona protein tayini uygulanmıştır (Tablo 4.2).



**şekil 3.21:** MWCO 3,5 ve 10 kDa ultrafiltrasyon membranları

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.4. Protein Hidrolizatlarının Biyoaktivite Analizleri

#### 3.4.1. ACE nleyici Aktivite Testi

Cushman ve Cheung (1971) alışması, kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. Hazırlanmış olan protein hidrolizatları (APH, BPH ve KPH) grubu örneklerin her biri  $200 \text{ mg.m}^{-1}$  olarak ayarlandı ve  $0.45 \text{ } \mu\text{l}$ 'lik PTFE filtrelerden geçirildi. Öncelikle  $90 \text{ } \mu\text{L}$  enzim etkinliğini azaltmak için inhibitör APH, KPH ve BPH protein hidrolizatları sırası ile  $50 \text{ } \mu\text{L}$  substrat zeltisi ( $6.5 \text{ mM}$  Hippüril-Histidil-Lösin) ile vorteksenerek karışması sağlanır ardından elde edilen karışım  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcı (inkübatör, su banyosu) içerisinde 10 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Sonrasında  $40 \text{ } \mu\text{l}$  ACE eklendi ve 1 saat daha inkübe edildi. Inkübasyon sonu,  $180 \text{ } \mu\text{l}$   $1\text{M}$  HCl ile tepkime durduruldu.

Protein hidrolizasyonunda APH (ayçekirdeği protein hidrolizati), KPH (kaşar peynir altı suyu protein hidrolizati) ve BPH (beyaz peynir altı suyu protein hidrolizati) kullanılmıştır. Negatif kontrol inkübasyonun gerçekleşmediği örnektir ve 20 mM Tris tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanır. Blank ise şahit kontrol ise; reaksiyonun gerçekleşmediği ve analiz esnasında meydana gelebilecek belirsizlikleri kapsayan kontrol örneğidir. Reaksiyonun gerçekleşmemesi için reaksiyon başlatılmadan numuneye HCl asit ilave edilmiş ve 20 mM Tris tampon çözeltisi kullanılarak aktivasyon başlamadan reaksiyon durdurulmuştur. Blank ve N.K; APH, KPH ve BPH örneklerindeki gibi inkübasyon işlemlerine tabi tutulmuştur.

ACE önleyici aktivite testi için (Şekil 3.6) yer alan Prominence LC-20A HPLC cihazı (Shimadzu Corporation, Japonya) kullanılmıştır. Mobil faz olarak %50 metanol+%0,1 TFA kullanılmıştır. Kolon olarak; NUCLEOSIL C18 kolonu (250 x 4,6 mM, por boyutu 100 Å, partikül büyüklüğü 5 µm, Macherey-Nagel, Almanya) kullanılmıştır. HPLC sistemi; sıvı kromatografi LC-20AD solvent dağıtıcı modülü, SIL-20A HT oto örnekleyici, DGU-20A5R degazer, SPD-20A UV-VİS dedektör ve CTO-10AS VP kolon fırınından oluşturulmuştur. Numunelerin enjeksiyon hacmi 10 µl, isokratik akış hızı 0.6 ml/dakika-1 olarak belirlenmiştir. ACE inhibisyon etkisi 228 nm'de izlenmiş, toplam analiz süresi ise; 12 dakika olarak ayarlanmıştır (Wu, Aluko ve Nakai, 2006). Negatif kontrol değerinde HHL substratının (Hippüril-Histidil-Lösin) ACE enzimi varlığında %100 hippurik asite dönüştüğü varsayılmıştır. Pik alanlarından yararlanılarak hesaplamalar bu varsayımına göre yapılmıştır. HA pikinin baskılandığı örnekler kontrol örneği ile kıyaslanarak örneklerin % inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları Tablo 4.5'te yer almaktadır.

### 3.4.2. DPP-IV Önleyici Aktivite Testi

DPP-IV önleyici aktivite analizi için su banyosu 37 C' ayarlandı. Örnekler şırınga yardımı ile 0.45 µm'lik PTFE filtreden geçirildi. 200 mg.m<sup>-1</sup>'lik hazırlanan APH, KPH ve BPH örnekleri (%2-5) olarak ayarlandı ve 0.45 µl'lik PTFE filtrelerden geçirildi. Ardından 50 µL enzim etkinliğini azaltmak için inhibitör APH, KPH ve BPH sırası ile 50 µL substrat çözeltisi Gly-Pro-pNA substratı (0.8 mmol.L<sup>-1</sup>) ile vortexlenerek karıştırıldı. Sonrasında elde edilen karışım 37°C'de çalkalayıcı inkübatör (su banyosu) vasıtasıyla 10 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Ardından 100 µl DPP-IV (0.01 U. mL<sup>-1</sup>)

<sup>1)</sup> eklenerek 1 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 200 µl 1M sodyum asetat (pH 4.0) tamponu ile tepkime durduruldu. Blank örnekte reaksiyonun gerçekleşmemesi beklendiğinden örnek yerine 100mM Tris ile analizin başında reaksiyonu durdurmak üzere sodyum asetat tamponu eklenmiştir. Yöntem Hildebrandt, (2000) kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. Negatif kontrol örneğinde de yine hidrolizasyon yerine inkübasyon gerçekleşmemesi için 100 mM Tris kullanıldı. Blank ve N.K; APH, KPH ve BPH örneklerindeki gibi inkübasyon işlemlerine tabi tutulmuştur.

### **3.5. Model Ürün Denemeleri**

Üretim ve depolama süreçlerinde model gıda ürünlerine eklenen hidrolizatlarda bulunan peptitlerin kararlılığı ve biyoaktivitesi incelenecektir.

Model ürünlerin hazırlanmasından önce, model ürünlerin üretilmesinde kullanılacak olan cihazların (bkz. Şekil 3.1- 3.14. ve Şekil 3.22) pratik kullanımı açısından ön denemeler kapsamlı olarak yapılmıştır. Model gıda ürünlerinin üretimi için hazırlanmış olan reçeteler ön denemelerde incelenmiş ve kararlılık, ürünlerin duyuşal özellikleri, ürün hacmi gibi nitelikler açısından aksaklık görülmesi durumunda reçetelerin ve üretim protokollerinin değiştirilmesi söz konusu olmuştur. Aşağıdaki bölümlerde nihai protokoller bilgilerinize sunulmaktadır.

Reçetelerin oturtulması ve detaylı olarak belirlenmesi açısından ilk etapta ön denemelerde protein izolat, hidrolizat veya hidrolizat fraksiyonları kullanılmamıştır. Gerekli denemeler bu reçeteler ile defalarca yapılarak sonraki çalışmalara hazır hale gelmiştir. Gereğinde depolama kararlılığını iyileştirmek amacıyla söz konusu ürünleri ilgilendiren mevzuat ile tutarlı koruyucu maddeler kullanılmıştır.

Model ürün denemelerine ay çekirdeği protein hidrolizat ve fraksiyonları eklenerek başlanılmıştır. Bunun nedeni ise, peynir altı suyu proteinlerinin ultrafiltrasyon aşamaları sebebiyle (hacmen 30 kat konsantre) daha zor ve az miktarda hazırlanıyor olmasıdır. Bir başka deyişle, peynir altı suyu numunelerinin hazırlanması daha zorlayıcı olduğu için hazırlanması ayçiçeği numuneleri ile yürütülmüştür. Bundan dolayı ay çekirdeği proteinleriyle ön denemeler çok sayıda gerçekleştirilerek tarifler netleştirilmiştir. Model ürünlerin hazırlanmasında ay çekirdeği hidrolizatı öncelikle

<10 kDa permeat fraksiyonu eklenerek başlanmıştır. Ekmek, vegan köfte ve yoğurt ürünleri (Şekil 3.23- 3.25) için uygun reçete ve yöntemler tasarlanmıştır.

### 3.5.1. Model Gıda Üretimi ve Depolama Koşulları

Ekmek ve yoğurt ürünleri laboratuvar koşullarında üretilmiştir. Şekil 3.22’de ekmek ve yoğurt makinesine ait görsel sunulmuştur.



**Şekil 3.22:** Ekmek ve yoğurt yapma makinesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tuzsuz ekmek üretim denemelerinde 240 ml 35°C su, 350 g un, 925 mg maya ve 2 g koruyucu (kalsiyum propiyonat, E282) kullanılmıştır. Söz konusu koruyucu, depolama deneylerinde ürünlerde küflenme görülmesi üzerine, ürünün mevzuatı kontrol edilerek seçilmiş ve eklenmiştir. Malzemeler belirtilen sıra ile cihazın yoğurma kabına konuldu. Belirtilen program, ekmek ağırlığı, kabartma seviyesi seçilir ve START (BAŞLAT) düğmesine basıldı. Kontrol, %2 APH ve %5 APH içeren 3 farklı ekmek türünden 7 günlük depolama süresi boyunca örnek toplanır. Oda sıcaklığında muhafaza edilen kontrol ekmeği ile %2 APH ve %5 APH içeren ekmeklerin her biri

oda sıcaklığına alınarak ayrı ayrı 0. 1. 2. 3. 4. ve 6. günlerde olmak üzere toplamda 6 defa numune ayrılır ve analizler için - 80°C de muhafaza edildi.



**Şekil 3.23:** Kontrol grubu ve ayçiçeği hidrolizati içeren ekmek örnekleri. (APH: ayçiçeği protein hidrolizati)

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Yoğurt üretiminde standart yoğurt eldesi için endüstriyel bir ürün olarak Yayla Maya markasına ait hazır probiyotik yoğurt mayası kullanılarak kontrol grubu yoğurt elde edilmiştir. Ardından %2 ve %5 APH hidrolizatından elde edilen <10 kDa fraksiyonları içeren yoğurtlar üretildi ve ürün kalitesi görsel değerlendirmeye tabi tutuldu. Raf ömrü analizleri için depolama süresince belirli aralıklarda toplam 6 defa ürün toplanmıştır. Toplanan örnekler ACE ve DPP-IV önleyici aktivite analizlerine tabi tutulmuştur. Peynir altı suyu protein hidrolizatları için de aynı analizler yapılmıştır.



**Şekil 3.24:** Ayçiçeği protein hidrolizatı (APH) içeren yoğurt örneği

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Vegan köfte eldesi için, ticari bir ürün olan Veggy vegan köfte karışımı, çukur bir kaptaki 250 ml (1 + 1/4 su bardağı) 90°C su ve 70 g sıvı yağ ekleyerek kaşıkla hafifçe karıştırıldı. Bu işlemi takiben karışım 15 dakika kadar soğumaya bırakıldı. Soğuyan harç iyice yoğuruldu. Köfteler benzer boyutlarda şekillendirilmesine dikkat edilerek hazırlandı. Köfteler fırın kâğıdı üzerine yerleştirildikten sonra 180°C'ye getirilmiş fırında, 15. dakikada ters-yüz edilip ve 20. dakikada fırından çıkarılmıştır. Protein fraksiyonu içeren köfteler ise %2 ve %5 oranında sıvı kısma eklenerek köfte harcına dahil edilmiştir.



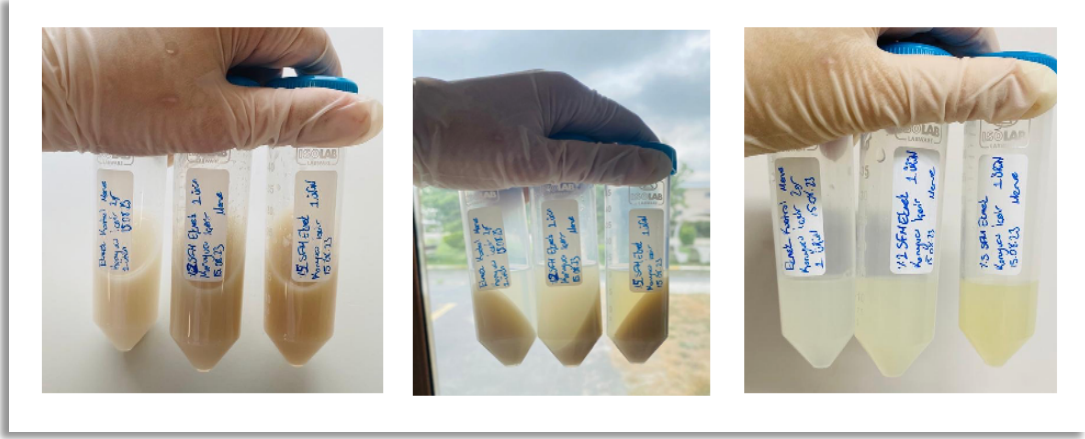
**Şekil 3.25:** Ticari vegan köfte karışımı örneği ve bu üründen elde edilen nihai köfte ürünü.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.5.2. Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması

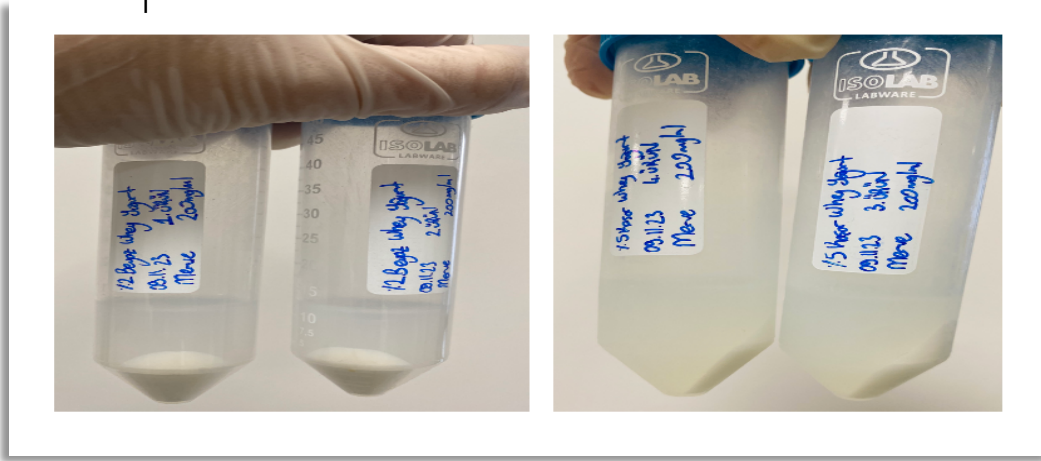
Tez kapsamında ekmek, yoğurt ve vegan köfte olmak üzere toplamda 3 farklı gıda ürünü hazırlanmıştır. Bu ürünler depolama sırasıyla 25 °C +4 °C ve -20 °C’de, muhafaza edilmiştir. Bu koşullar sırası ile her ürün için kontrol grubu %2 APH ve ve %5 APH içeren numuneler depolanmıştır. Farklı depolama koşullarında muhafaza edilen her bir üründen depolama süresi baz alınarak toplamda 6 adet numune alınmış ve bu numuneler gerekli ön işlemlerden geçirilerek ACE ve DPP-IV önleyici aktivite analizlerine tabi tutulmuştur.

ACE ve DPP-IV önleyici aktivite analizleri için Girgih, Udenigwe ve Aluko (2011) çalışması kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. Analiz öncesi ürünlere uygulanan ön işlemler için Sırası ile 200 mg.ml<sup>-1</sup> örnek hazırlamak için yaklaşık 2 g numune 10 ml 20 mM Tris tampon çözeltisi bir falkona alınarak vortekstlendi. Ardından 2 dk süre ile yüksek devirli karıştırıcı (shear mixer) vasıtasıyla 10.200 rpm’de homojenize edildi. Elde edilen ürünler 5 dk boyunca 10.000x G ile santrifüj edildi ve süpernatant toplandı.



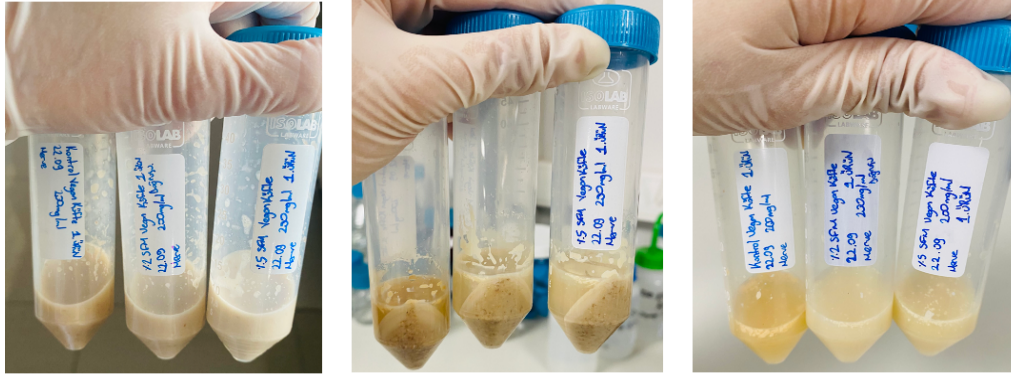
**Şekil 3.26:** Tris buffer tampon çözeltisi ( $200 \text{ mg.m}^{-1}$  20 mM) içeren, ekmeğ (kontrol, %2-5 APH) örnekleri vortekslenildi. Ardından yüksek devirli karıştırıcı vasıtasıyla 10.200 rpm'de 2 dk boyunca homojenizasyonu gerçekleşen ürünler  $10.000 \times G$ 'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant toplandı. Şekilde santrifüj işlemi öncesi ve sonrası ekmeğ örnekleri ile süpernatant ekmeğ örnekleri yer almaktadır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.27:** Santrifüj (5 dk,  $10.000 \times G$ ) işlemi sonrası, 20 mM Tris içeren yoğurt (%2 beyaz peynir altı suyu protein hidrolizati içeren) örnekleri, 5 dk boyunca  $10.000 \times G$  santrifüj sonrası, 20 mM Tris tamponu içeren yoğurt (%5 kaşar peynir altı suyu protein hidrolizati içeren yoğurt) örnekleri

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



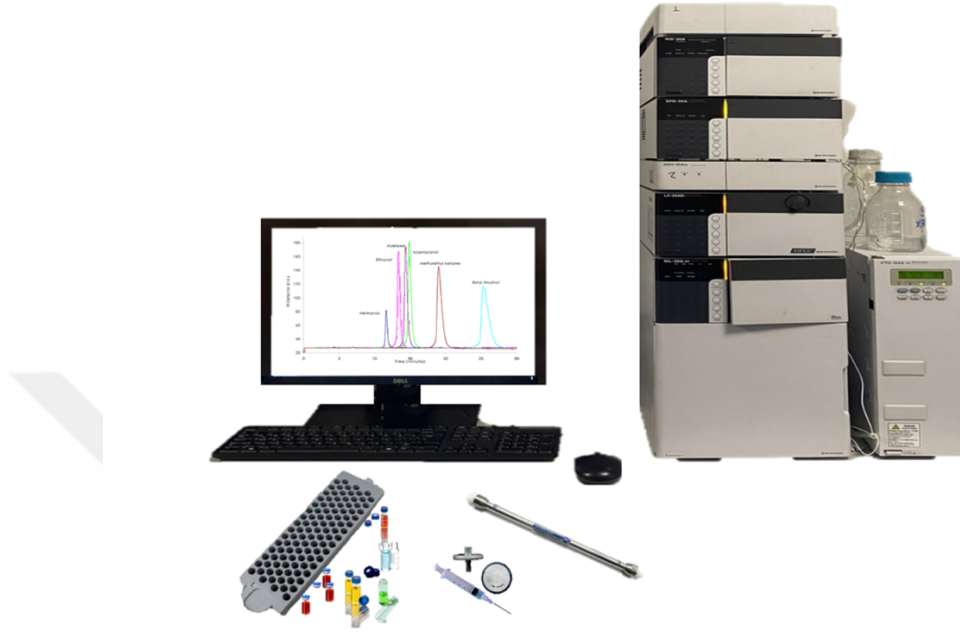
**Şekil 3.28:** Tampon çözeltiye (20 mM Tris) alınmış vegan köfte (kontrol, %2 - %5 APH) örneklerinin 5 dk, 10.000x G santrifüj edilmesi ve santrifüj sonrası alınan 200 mg.m<sup>-1</sup> süpernatant vegan köfte örnekleri

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ancak yapılan bu ön işlem ACE önleyici aktivite analizleri için uygun olsa da DPP-IV önleyici aktivite analizlerinde safsızlık ve bulanıklık nedenleri ile absorbans değerinin okunması güçleşmiş ve bu aşamada hiçbir ürün grubu için sonuç alınamamıştır. Bu nedenle çeşitli çalışmalar neticinde metot geliştirilmiş ve alkali ekstraksiyon izoelektrik çöktürme AE-IP metodu kısmen değiştirilerek ürün gruplarının tamamında (ekmek, yoğurt ve vegan köfte) ön işlem safhasına eklenmiştir. Dolayısı ile DPP-IV analizi öncesi ön işlemlere ek olarak AE-IP metodu gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür.

DPP-IV önleyici aktivite analizi öncesi kontrol, %5 APH, KPH ve BPH içeren ekmek, yoğurt ve vegan köfte ürünleri öncelikle; 1:5 oranında saf su ile karıştırıldı ve vortekslandı. Ardından 2 dk süre ile yüksek devirli karıştırıcı (shear mixer) vasıtasıyla 10.200 rpm hızında homojenize edildi. Homojenize ürünler behere aktarıldı ve 1N NaOH yardımı ile pH 9.5'e ayarlandı ve 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda 1 saat kadar karıştırıldı. Elde edilen ürünler 20 °C'de, 5 dk 10.000x G ile santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. Süpernatant behere aktarıldı ve 1 N HCl yardımı ile pH 4.5 değerine ayarlandı ve tekrar 20 °C'de, 5 dk 10.000x G hızında santrifüj edildi. Katı kısım (pellet) spatül yardımı ile alınarak tartıldı ve 1:10 saf su ile vorteks vasıtasıyla

karıştırıldı. Ardından 2 dk süre ile yüksek devirli karıştırıcı vasıtasıyla 10.200 rpm’de homojenize edildi. Homojenize ürünler 0.22 µm (mikrometre) CA filtreden geçirilerek DPP-IV – önleyici aktivite analizine hazır hâle getirilerek analizler yapıldı.



**Şekil 3.29:** Hazırlanan örnekler 0.45 µm’lik PTFE filtreden geçirildikten sonra viallere alınarak ACE – önleyici aktivite analizi için HPLC cihazına verilir. ACE inhibisyon analizi; (Mobil faz A; %50 metanol, %50 saf su, %1TFA içermektedir.) ACE kolonu olarak EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 REF; 720014.46 kullanıldı ve kolon fırını sıcaklığı 40°C da 228 nm’ye set edilerek çalışılmıştır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

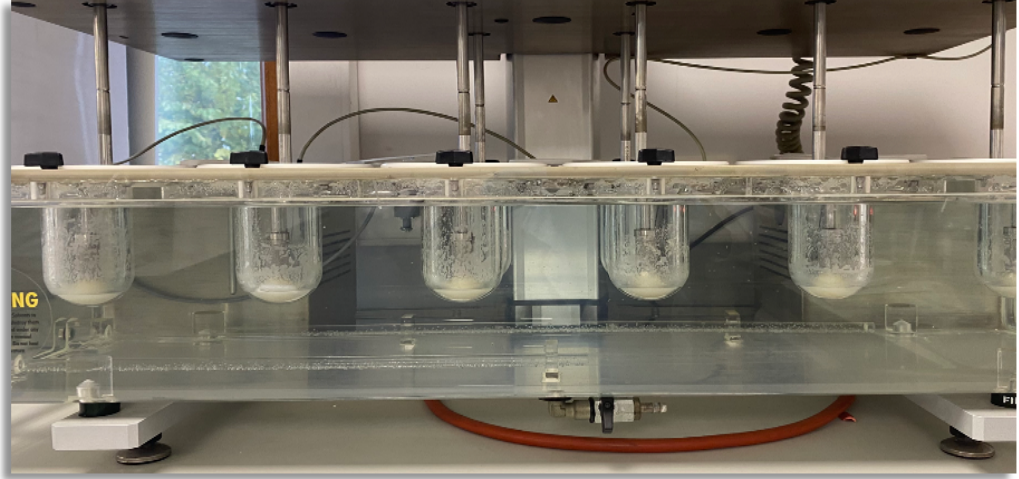
### 3.6. İstatistiksel Analiz

Araştırma kapsamında hazırlanan vegan köfte, ekmek ve yoğurt grupları farklı depolama sürelerinde (%2 ve %5 oranlarında) değerlendirilmiştir. ACE inhibisyon oranları, kromatografik yöntemlerle analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler, gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için ANOVA, Tukey testi ve T-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir analiz, %95 güven aralığında değerlendirilmiş ve anlamlılık sınırları  $p < 0.05$  olarak belirlenmiştir.

### 3.7. Ürünlerin Simüle Edilmiş (*In Vitro*) Sindirimi

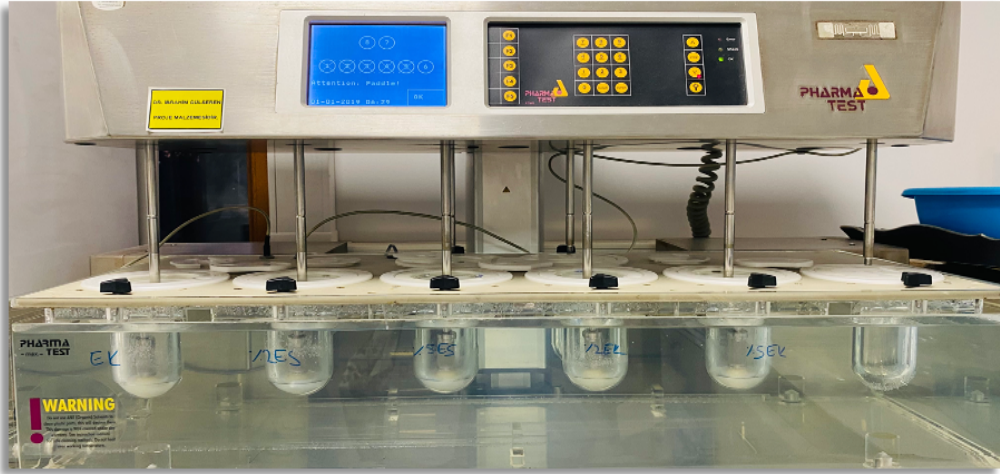
Sindirim protokolü sadece taze hazırlanmış (0. gün) ekmek, vegan köfte ve yoğurt numunelerine uygulandı. Numunelere %2 ve 5 oranlarında hidrolizat eklendi (Kontrol- %2APH-%5APH (ayçiçeği hidrolizatı)- %2KPH-%5KPH- (kaşar peynir hidrolizatı) %2BPH-%5BPH- (beyaz peynir hidrolizatı)) 7 farklı içerikte üretimi ve depolama sonrası sindirimi ile toplamda 21 farklı ürün sindirim protokolüne dahil edilmiştir.

Bu çalışmada Minekus, M. ve diğerleri, (2014) çalışması kısmen değiştirilerek uygulanmıştır. Şekil 3.5'te yer alan disolüsyon cihazı su sıcaklığı 37°C ayarlandı. Protein miktarı/ saf su 38 mg.ml<sup>-1</sup> saf su olacak şekilde kontrol / %2 (APH, KPH, BPH) / %5 (APH, KPH, BPH); Hidrolizat içeren yoğurt, ekmek ve vegan köfte ürünleri için hepsi ayrı ayrı hesaplandı ve tarıldı. Üzerine 5 ml saf su ilave edilerek çözdürüldü (Şekil 3.30-3.32). 0,1 N HCl ile karışım pH 2'ye ayarlandı. Toplam protein miktarının %4'ü kadar pepsin eklendi. Ardından laboratuvar tipi disolüsyon cihazı ve USP-2 uyumlu aparatı vasıtasıyla 1 saat 37°C 100 rpm hızda karıştırılmaya başlamadan önce ortamdan örnek alındı. Sonrasında karıştırma işlemi başlatıldı ve 30.-60. dk'larda örnek toplandı. Ardından 0.9 M NaHCO<sub>3</sub> (sodyum bikarbonat) ile pH 5.3'e ayarlandı ve karışıma %4 Pankreatin eklendi. Daha sonra pH 7.5 1 M NaOH ile ayarlandı ve 100 rpm hızında 37°C 2 saat daha karıştırıldı. Ardından 90-180. dakikalar arasında örnek toplandı ve sonrasında 90°C'de 5 dk inkübasyon işlemi gerçekleştirilerek enzim inaktivasyonu sağlandı. Son olarak Şekil 3.9'da görülen Hitachi Centrifuge -CR22N-N62567 (Japonya) tipi santrifüj cihazında 10.000x G de 5dk santrifüj işlemi yapılarak süpernatant toplandı ve Şekil 3.33- 3.35'te görüldüğü gibi eppendorf tüplerine alındı. Yarım saat aralıklarla toplanan numuneler ait numuneler biyoaktivite testlerine tabi tutulmak üzere -80°C muhafaza edildi.



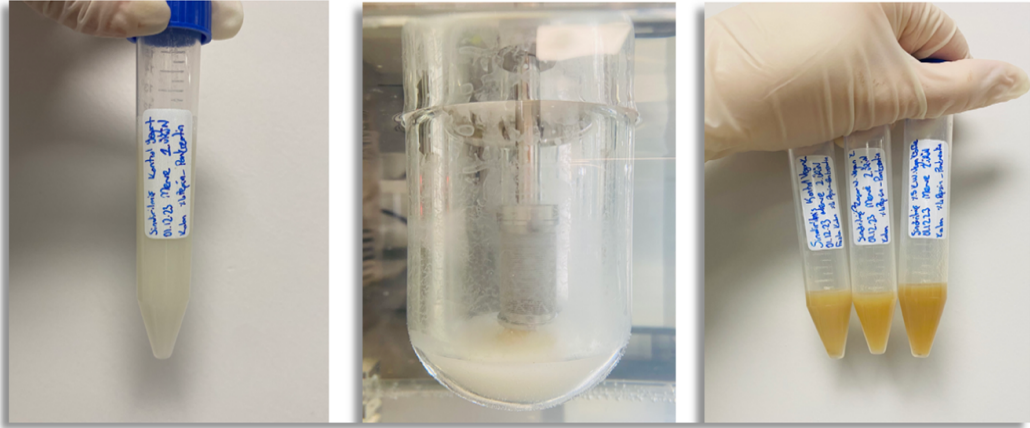
**Şekil 3.30:** Kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH hidrolizatları içeren yoğurt örneklerinin üretim günü (0. gün) *in vitro* simülasyonu

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



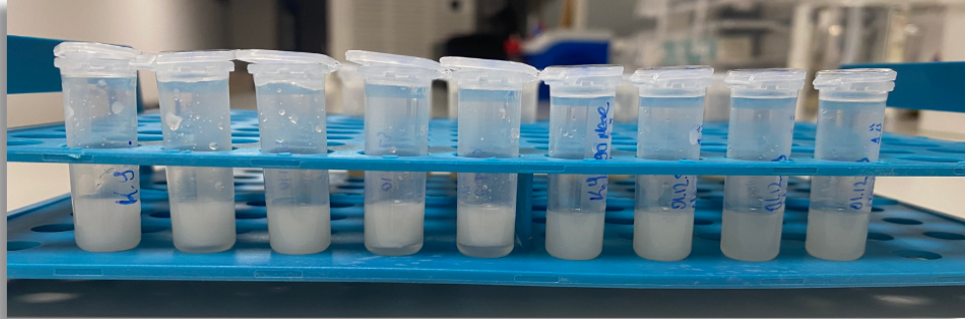
**Şekil 3.31:** Üretim günü (0. gün) Kontrol, (%2-5) APH ve KPH hidrolizatları içeren ekmek örneklerinin *in vitro* simülasyonu

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.32:** Protein oranı  $38 \text{ mg.m}^{-1}$ , pH 2, 1 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pepsin (mide ortamı) ve pH 7.5, 2 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pankreatin (bağırsak ortamı) içeren üretim günü (0. gün) vegan köfte ve üretim günü (0. gün) yoğurt örneklerinin 180 dk'lık sindirimi ve 5 dk  $10.000\text{x G}$  santrifüj sonrası elde edilen süpernatant.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.33:** Protein oranı  $38 \text{ mg.m}^{-1}$  pH 2, 1 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pepsin (mide ortamı) ve pH:7.5, 2 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pankreatin (bağırsak ortamı) içeren üretim gününe (0. gün) ait ekmek kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH içeren ekmek örneklerinin 180.dk'lık sindirimi ve 5 dk  $10.000\text{x G}$  santrifüj sonrası elde edilen süpernatant.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 3.34:** Protein oranı  $38 \text{ mg.m}^{-1}$ , pH 2, 1 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm, %4 pepsin (mide ortamı) ve pH 7.5, 2 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pankreatin (bağırsak ortamı) içeren üretim günü (0. gün) vegan köfte kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH örneklerinin 180.dk'lık sindirimi ve 5 dk  $10.000x$  G santrifüj sonrası elde edilen süpernatant.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

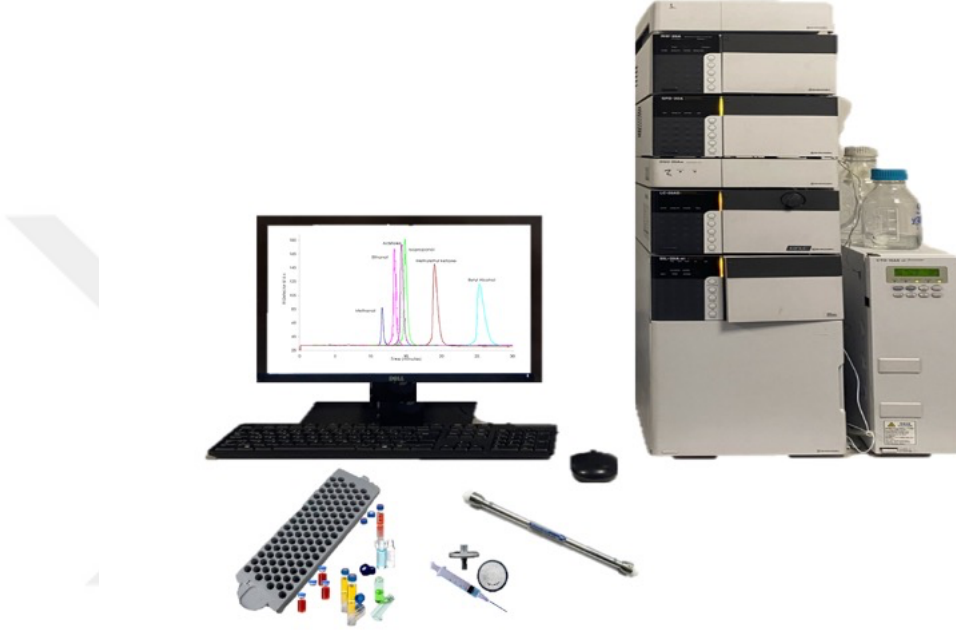


**Şekil 3.35:** Protein oranı  $38 \text{ mg.m}^{-1}$ , pH 2, 1 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pepsin (mide ortamı) ve pH 7.5, 2 saat  $37^\circ\text{C}$  100 rpm %4 pankreatin (bağırsak ortamı) içeren üretim günü (0. gün) yoğurt kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH örneklerinin 180.dk'lık sindirimi ve 5 dk  $10.000x$  g santrifüj sonrası elde edilen süpernatant.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.7.1. Sindirim Protokolü Uygulanmış Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması

Sindirilmiş ekmek, yoğurt ve vegan köfte ürünlerinin %ACE önleyici aktivite testi için Şekil 3.36’da yer alan HPLC cihazından istifade edilmiştir.



**Şekil 3.36:** Kontrol ve %5 hidrolizat (APH, KPH ve BPH içeren ekmek, vegan köfte ve yoğurt örneklerinin sindirim sonrası 180.dk ACE inhibisyon analizi; (Mobil faz A; %50 metanol, %50 saf su ve %1TFA içermektedir.) ACE kolonu olarak EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 REF; 720014.46 kullanıldı ve kolon fırını sıcaklığı 40°C da 228 nm’ye set edilerek çalışılmıştır.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

## **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

### **BULGULAR ve TARTIŞMA**

#### **4.1. Proteinlerin Eldesi ve Proteolitik Muameleler**

Ayçiçeği, beyaz ve kaşar peynir altı suyu proteinlerinin elde edilmesinde, enzimatik hidroliz yönteminden istifade edilmiştir. Proteolitik enzim varlığında proteinlerin daha küçük peptit ve amino asitlere parçalanması sağlanmıştır.

##### **4.1.1. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Eldesi**

Beyaz ve kaşar peynir altı suyu numunelerinin ultrafiltrasyon (UF) yöntemi ile konsantrisinde protein izolatının %protein değeri Kjeldahl yöntemiyle %88,2 olarak bulunmuştur. Peynir altı suyu proteinleri, yağsız kaşar ve beyaz peynir altı sularının konsantre halde eldesi için ultrafiltrasyon prosesinde (Şekil 3.3) ve 10 kDa MWCO membran (Şekil 3.21) kullanılmıştır. Bu işlem ile peynir altı suyu hacmen 30 kat konsantre edilerek yapılmıştır. Ön denemeler sırasında literatürde yer alan çalışmalar temel alınarak farklı hidroliz süreleri denenmiştir. Hidroliz işlemi sırasında, proteaz enzimi olarak ilk etapta Alkalaz enzimi (2 saat boyunca 50°C), sonrasında ise Flavorzim (4 saat boyunca 50°C) kullanılmıştır.

##### **4.1.2. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Protein Hidrolizi**

Ayçiçeği protein izolatı, kaşar peynir altı suyu ve beyaz peynir altı suyu örnekleri her biri 25 g tartıldı ve üzerine 250 ml saf su ilave edildi. Çözeltinin uzun süreli muhafazası için içerisine %0.2 Soydum azit koruyucu ilave edildi. Elde edilen çözeltiliye %1 Alkalaz (Alc) enzimi ilave edilerek pH 8'e ayarlandı ve 2 saat boyunca 50°C da su banyosunda bekletildi. Ardından, %1 Flavorzim (Flv) enzimi ilave edilerek 4 saat pH 6-7 arasında olacak şekilde 50°C da su banyosunda hidrolizatlar hazırlandı. Elde edilen hidrolizatların 95°C da 5 dk su banyosunda enzim inaktivasyonu sağlandı ve ürünler 10 dk buzda bekletildi ardından 4°C'da mufaza edildi.

#### 4.1.3. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Numunelerinin %Nem, %Protein ve Kül Tayini

Ayçiçeği çekirdeğinin besin öğeleri kompozisyonu Tablo 4.1’ de yer almaktadır. Ayçiçeği protein izolatu %88.4 ± 0,9 protein içerdiği bulgulanmıştır. Soğuk pres işleminde de yağın büyük bir kısmı çıkarıldığı için izolatu protein oranı artmıştır. Protein izolatu, düşük nem içeriğine sahiptir, bu da raf ömrü yüksek bir ürün anlamına gelmektedir. Kül miktarı, ürünlerin mineral içeriği hakkında bilgi vermektedir ve protein izolatında nispeten düşük seviyelerde bulunmaktadır. Karbonhidrat içeriği bakımından da protein izolatu düşük karbonhidrat içeriğine sahiptir.

Bu veriler ışığında ayçiçeği protein izolatının yüksek protein içeriği ve düşük yağ, nem, kül ve karbonhidrat içeriği ile daha konsantre bir protein kaynağı olduğu görülmektedir. Soğuk pres ay çekirdeği keki ise, yağın büyük bir kısmının çıkarılmasıyla protein içeriği artmış bir üründür.

**Tablo 4.1:** Ayçekirdeği örneklerinin besin öğeleri kompozisyonu.

	Protein (%)	Nem (%)	Yağ (%)	Kül (%)	Karbonhidrat (%)
<b>Kabuksuz iç ay çekirdeği</b>	23.1±0,5c	7.5±0.8b	54.8±0.2a	3.8±0.4b	10.8±0.22
<b>Soğuk pres ay çekirdeği keki</b>	38.7±0,3b	9.6±0.5a	10.8±0.7b	6.7±0.5a	35,6±1.1
<b>Ay çekirdek protein izolatu</b>	88.4±0,9a	4.4±0.2c	1.2±0.3c	1.8±0.1c	2.38±0.2

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

#### 4.1.4. Kjeldahl Analizleri

Farklı protein kaynaklarının ve işleme yöntemlerinin protein içeriği üzerindeki etkisi Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Konsantrasyon ve hidroliz işlemleri, protein içeriği üzerinde etkilidir ve sindirimi kolaylaştırmak için kullanılabilir.

**Tablo 4.2:** Örneklerin protein içerikleri (%)

Örnek	% Protein
Ay çekirdeği keki	53.84 ± 0.4
API	88.4 ± 0.9
APH	6.44 ± 0.0
APH 10 kDa retentate	34.07 ± 3.0
APH 10 kDa permeate	2.58 ± 0.0
APH 3 kDa retentate	5.02 ± 0.2
Kaşar PAS	1.41 ± 0.1
Kaşar PAS 5 kat hacmen konsantre edilmiş fraksiyon	6.1 ± 0.1
Kaşar PAS 30 kat hacmen konsantre edilmiş fraksiyon	10.78 ± 0.9
Beyaz PAS	0.53 ± 0.0
Beyaz PAS 5 kat hacmen konsantre edilmiş fraksiyon	2.46 ± 0.1
Beyaz PAS 30 kat hacmen konsantre edilmiş fraksiyon	5.46 ± 0.1

API: Ayçekirdeği protein izolatu, APH: Ayçekirdeği protein Alkalaz ve Flavorzim hidrolizatı, PAS: Peynir altı suyu

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

#### 4.1.5. TNBS Yöntemi ile Hidroliz Derecesinin (%DH) Belirlenmesi

Enzimatik proteoliz etkinliği arttıkça numunelerin hidroliz derecesi de artmaktadır. Buna bağlı olarak protein hidrolizatlarının teknik ve biyolojik özellikleri, numunelerin hidroliz derecesine bağlıdır. Tablo 4.3 farklı hidroliz sürelerinin ayçiçeği protein hidrolizatları ve çeşitli peynir altı suyu protein hidrolizatları üzerindeki etkilerini göstermektedir. Verilere göre, ayçiçeği protein hidrolizatlarının 4 saatten sonra hidroliz derecesinde önemli bir artış gözlenmemektedir. Bu durum 4 saatlik sürenin optimum hidroliz derecesine ulaşmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Kaşar ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarında zamana bağlı artış gözlenirse de 4 saatlik sürede elde edilen hidroliz derecesi belirli bir seviyeye ulaşmıştır. APH, KPH ve BPH numunelerinin hidroliz derecesi analizine ait görseli Şekil 4.1 de yer almaktadır.

**Tablo 4.3:** Hidroliz derecesi (%DH) analiz sonuçları.

Örnek	Flavorzim süresi (saat)	% DH
APH	2	13.24 ± 0.7
APH	4	16.35 ± 1.0
APH	18	16.38 ± 0.3
KPH	2	3.83 ± 0.4
KPH	4	4.46 ± 0.5
KPH	18	9.63 ± 0.8
BPH	2	7.98 ± 1.4
BPH	4	10.10 ± 0.3
BPH	18	13.41 ± 10.4

APH: Ayçiçeği protein hidrolizati, KPH: Kaşar peynir altı suyu hidrolizati, BPH: Beyaz peynir altı suyu hidrolizati, DH: Hidroliz derecesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 4.1:** Sırasıyla kaşar peynir altı suyu protein hidrolizati (KPH), ayçiçeği protein hidrolizati (APH) ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarının (BPH) hidroliz derecesi analizinin (TNBS) yapılması.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ayçiçeği protein hidrolizatları kapsamında ve farklı moleküler ağırlığında elde edilen fraksiyonlarının hidroliz dereceleri Tablo 4.4'te sunulmuştur. Numunelerin moleküler ağırlık azaldıkça hidroliz derecesinin arttığı gözlenmektedir. Bu durum, daha küçük moleküllerin enzimler tarafından daha kolay parçalandığını ve hidrolize uğradığını gösterir.

**Tablo 4.4:** Hidrolizat ve fraksiyonların hidroliz derecesi (%DH) analiz sonuçları.

Örnek	% DH
APH	16.35 ± 1.0
APH >10 kDa	60.63 ± 2.3
APH <10 kDa	67.81 ± 1.2
3<APH <10 kDa	78.51 ± 1.1

APH: Ayçiçeği protein hidrolizatı, DH: Hidroliz derecesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

#### 4.2. Ayçiçeği, Beyaz ve Kaşar Peynir Altı Suyu Hidrolizatlarının Biyoaktivite Analizleri

Protein hidrolizatlarına ve ultrafiltrasyon fraksiyonlarına DPP-IV (dipeptidil peptidaz) ve ACE önleyici aktivite testleri uygulanmıştır. Elde edilen inhibe edici aktivite sonuçları Tablo 4.5 üzerinde gösterilmektedir. APH için elde edilen verilerde sırasıyla 10 kDa ve 3 kDa membranlardan geçmiş olan filtratlar % DPP-IV ve % ACE inhibisyon testlerinde daha yüksek etkinlik göstermiştir. İki kaset (10-3 kDa) arası elde edilen hidrolizatların toplam filtratlardan daha az aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayçiçeği hidrolizatlarına ait fraksiyonların, % DPP-IV önleyici aktivite açısından peynir altı suyu numunelerinden elde edilen hidrolizat ve fraksiyonlar nispetle daha etkili olduğu görülmektedir. Beyaz ve kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatlarının % DPP-IV inhibisyon aktivite değerleri sırasıyla 31,1% ve 36,4% olarak belirlenmiştir. Tüm hidrolizat çeşitlerine ait fraksiyonlarda % DPP-IV inhibisyon aktivite değerleri açısından 3 kDa'dan membrandan geçmiş fraksiyonların en yüksek enzim önleyici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, peynir altı suyu hidrolizatlarının % ACE inhibisyon aktivite testi açısından ayçiçeği protein hidrolizat

ve fraksiyonlarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Önceki literatürde süt proteinlerinin antihipertansif etkileri alanında yaygın sayılabilecek ölçüde yayınlar (Koçak ve Şanlı, 2016) bulunmakla birlikte, benzer literatürün ayçiçeği numuneleri için kısıtlı olduğu söylenebilir (Clemente et al., 1999). Dolayısıyla mevcut bulgular, önceki çalışmalar ile tutarlıdır. Beyaz ve kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı ve fraksiyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise beyaz peynir altı suyu prosesinden elde edilen fraksiyon ve hidrolizatların ACE ve DPP-IV önleyici aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5:** Protein hidrolizatlarının %DPP-IV ve %ACE inhibisyon aktivite değerleri.

Örnek	%DPP-IV inhibisyonu	% ACE inhibisyonu
APH	-	79.7 ± 3.8
APH <10 kDa	70.6 ± 3.2	96.3 ± 0.1
3<APH <10 kDa	33.3 ± 1.8	75.5 ± 3.7
3<APH <5 kDa	53.7 ± 3.3	93.7 ± 7.7
5<APH <10 kDa	55.0 ± 1.2	83.0 ± 4.6
APH <5 kDa	53.8 ± 2.2	84.3 ± 12.5
APH <3 kDa	75.0 ± 0.3	86.7 ± 2.0
KPH	36.4 ± 9.4	90.6 ± 1.2
KPH <10 kDa	71.1 ± 6.7	98.2 ± 1.2
3<KPH <10 kDa	33.3 ± 1.8	100.0 ± 1.3
KPH <3 kDa	75.0 ± 0.3	91.4 ± 5.9
BPH	31.1 ± 2.1	100 ± 0.7
BPH <10 kDa	72.6 ± 6.9	100 ± 5.9
3<BPH <10 kDa	72.3 ± 2.4	100 ± 2.5
BPH <3 kDa	75.0 ± 0.3	92.1 ± 6.0

**APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu hidrolizatı, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu hidrolizatı

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 4.3 Model Gıda Ürünlerine Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması

#### 4.3.1. ACE Önleyici Aktivite Testi

Model ürünler için hazırlanan kontrol ve protein fraksiyonları eklenen örnekler için % ACE inhibe edici aktivite testine ait APH eklemek, yoğurt ve vegan köfte ürünlerinde 0. Güne ait sonuçlar Tablo 4.6 üzerinde verilmiştir. Ekmek ve köfte model örneklerinde,

peptit fraksiyonlarının eklenmesinin % ACE inhibisyon aktivite değerlerini iyileştirdiği görülmüştür. Özellikle %5 oranında peptit fraksiyonları eklenen model ürünlerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Diğer yandan, kontrol yoğurt örneğinin ise %2 APH'ye kıyasla daha yüksek % ACE inhibe edici aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak, yoğurdun fermentasyonu sırasında ortaya çıkan süt peptitlerinin kontrol örneğinde daha etkin olduğu dşnlmektedir. Probiyotik yoğurt mayası olarak standart bir ürün eldesi için yayla maya probiyotik yoğurt markası kullanılmıştır. rn içeriğinde bulunan, *Streptococcus thermophilus*, süt asitliğini arttıarak kıvam vermektedir. *Lactobacillus acidophilus*, sindirim sistemi sağlığına katkıda bulunmaktadır. *Bifidobacterium animalis spp. lactis*; bağırsak sağlığını desteklemektedir.

ACE inhibisyonunun kontrol yoğurt numunelerinde yüksek bulunmasının birden fazla nedeni olabilir. Bunlar kullanılan hidrolizatın etkisine, doz ve konsantrasyonuna, bakteri aktivitesine, süt yağı içeriğine ve probiyotik bakterilerin etkisine bağlıdır (Gürbüz, Erkaya Kotan, Grmeri ve şengül, 2023).

Probiyotik bakterilerin aktivitesi, ayçiçeği hidrolizatı ile etkileşime girmiş olabilir. Bu etkileşim sonucunda ACE inhibisyonu artma potansiyeli vardır. Ayçiçeği hidrolizatı, içerdiği biyoaktif bileşenler nedeniyle ACE inhibisyonunu arttırabilir. Bu bileşenler, kan basıncını düzenleyen enzim olan ACE'yi etkileyebilir. Ayçiçeği hidrolizatının eklenme oranının etkili olduğu bulunmuştur (%2 ve %5). Probiyotik bakteriler, sütün fermentasyonunda enzimler aracılığıyla peptitleri oluşturmaktadır. Bu peptitler, ACE inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Ayçiçeği hidrolizatı içeren yoğurt numunelerinin %ACE inhibisyonu etkisinin artmış olabileceği dşnlmektedir. Süt yağı içeriğine bağlı olarak, ayçiçeği hidriolizatı eklenen yoğurtlarda süt yağı oranı değişmiş olabilir. Burada süt yağı miktarı, ayçiçeği hidrolizatının süt yağının içerdiği yağ asitleri (zellikle doymamış yağ asitleri) bileşimindeki rolü, tekstür ve lezzet farklılığı da dolaylı olarak süt yağı bileşimini etkileyebilir. Dolayısı ile süt yağı da ACE inhibisyonunu etkileyebilir.

**Tablo 4.6:** Depolama süresi ( $t=0$ ) model gıda ürünlerin ACE-önleyici aktivite (%) analiz sonuçları.

Örnek	% ACE inhibisyonu
Kontrol Yoğurt	27.4 ± 1.1
%2 APH Yoğurt	23.8 ± 1.8
%5 APH Yoğurt	29.3 ± 1.6
Kontrol Ekmek	16.4 ± 0.1
%2 APH Ekmek	23.2 ± 0.1
%5 APH Ekmek	32.4 ± 0.1
Kontrol Vegan Köfte	43.1 ± 0.0
%2 APH Vegan Köfte	84.9 ± 0.9
%5 APH Vegan Köfte	80.6 ± 2.5

**APH:** Ayçiçeği protein hidrolizati

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Depolama süresince muhafaza edilen kontrol, %2-5 (APH, KPH ve BPH) hidrolizatları içeren vegan köfte ürünlerinin %ACE aktivite inhibisyon değerleri Tablo 4.7’de yer almaktadır. Etiket bilgilerine göre vegan köfte karışımı bezelye proteini içermektedir. Bezelye proteini, ACE inhibisyonu potansiyeli bulunan triptofan, lizin ve arginin gibi amino asitler bakımından zengindir. Bu peptitler, depolama sırasında değişikliğe uğrayarak daha etkin hâle gelebilir (Esen, 2022). Vegan köftenin içindeki bitkisel proteinler, depolama sırasında fermentasyona uğrayabilir. Fermentasyon, ACE inhibisyonu sağlayan peptitlerin oluşumunu arttırabilir (Esen, 2022). Örneğin, bir çalışmada, soya proteini ile hazırlanan vegan köftelerin fermentasyonu sonucunda ACE inhibisyonu aktivitesini %40 arttığı gösterilmiştir.

Vegan köftenin içindeki bitkisel proteinler, depolama sırasında hidroliz olabilir. Hidroliz, ACE inhibisyonu sağlayan peptitlerin serbest kalmasını sağlar (Eroğlu, 2016). Örneğin, bir çalışmada, kinoa proteini ile hazırlanan vegan köftelerin hidrolizi sonucunda ACE inhibisyonu aktivitesinin %60 arttığı gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, vegan köftenin depolama sürecinde ACE inhibe edici aktivite testinde gözlemlenen artışın, köftenin içindeki bitkisel proteinlerin değişikliğe uğramasıyla ilgili olabileceği söylenebilmektedir.

Tablo 4.7’de depolama süresince %ACE inhibisyon değerlerinde bazı dalgalanmalar gözlemlenmektedir. Kontrol vegan köfte (KVK) değerleri; genel olarak dalgalı bir seyir izlemektedir. Depolamanın 4. ayında en yüksek değeri (85.3) gösterirken, 5. ayda en düşük değeri (61.7) gösterdiği görülmektedir. APH %2; 4. ayda en yüksek değeri (96.4) göstermektedir. Değerler genel olarak yüksek, ancak 6. ayda bir düşüş gözlemlenmektedir (69.3). %5 APH; 4. ayda en yüksek değeri (88.0) gösteriyor. 2. ayda belirgin bir düşüş vardır (51.9), ancak diğer aylarda sonuçlar daha dengelidir. %2 KPH; değerler genel olarak düşüktür ve 4. ayda en düşük değeri (57.6) göstermektedir. %5 KPH, 4. ayda en yüksek değeri (91.6) göstermektedir. Değerler genel olarak yüksek ve stabildir. %2 BPH, 2. ayda en yüksek değeri (82.5) göstermektedir. Değerler genel olarak stabil, ancak 6. ayda bir düşüş görülmektedir (65.0). %5 BPH, 4. ayda en yüksek değeri (80.7) göstermektedir. Değerler genel olarak stabildir.

Ayçiçeği, beyaz ve kaşar peynir altı suyu numuneleri ve konsantrasyonları (%2-%5) arasında farklılıklar vardır. APH %2, 4. ayda en yüksek değeri gösterirken (96.4), APH %5 4. ayda (88.0) değerine sahiptir. APH %2 genel olarak daha yüksek ve stabil değerler göstermektedir. KPH, %2 KPH değerleri genel olarak düşük ve dalgalıdır. KPH %5 ise daha yüksek ve stabil değerler göstermektedir, özellikle 4. ayda (91.6). BPH, %2 BPH ve %5 BPH grupları arasında büyük farklar yoktur, ancak %2 BPH 2. ayda en yüksek değeri göstermektedir (82.5). BPH %5 ise 4. ayda en yüksek değeri göstermektedir (80.7).

Hidrolizat içeren (%2-%5) numuneler arasındaki farklılıklardan bahsetmek gereksirse, %2 hidrolizat içeren numuneler, genellikle daha düşük ve dalgalı değerler göstermektedir. Ancak %2 APH, 4. ayda en yüksek değeri (96.4) göstermektedir. %5 hidrolizat içeren gruplar ise genellikle daha yüksek ve stabil değerler göstermektedir. Özellikle %5 KPH ve %5 APH, 4. ayda yüksek değerleri göstermiştir (91.6 ve 88.0).

Sonuç itibari ile depolama süresince değişim değerleri dalgalanma göstermektedir, ancak bazı gruplar (özellikle %5 hidrolizat içerenler) daha stabil ve yüksek değerler sergilemektedir. Ayçiçeği, beyaz ve kaşar peynir altı suyu numuneleri arasındaki farklılıklar incelenecek olursa, APH grubu genel olarak daha yüksek %ACE inhibisyon değerlerine sahiptir. KPH grubu ise %5 hidrolizat içerenlerde daha iyi performans göstermektedir. Hidrolizat içeren (%2 ve %5) gruplar arasındaki farklılıklar ise %5 hidrolizat içeren gruplar genel olarak daha yüksek ve stabil %ACE inhibisyon değerlerine sahiptir. Bu veriler incelendiğinde, özellikle %5 hidrolizat

içeren grupların %ACE inhibe edici aktivite açısından daha etkili olduğu söylenebilmektedir.

**Tablo 4.7:** Depolama süresince muhafaza edilen Kontrol, %2-5 (APH, KPH ve BPH) grubu vegan köfte ürünlerinin %ACE aktivitesi inhibe edici değerleri

	<b>KVK</b>	<b>%2APH</b>	<b>%5APH</b>	<b>%2 KPH</b>	<b>%5KPH</b>	<b>%2BPH</b>	<b>%5BPH</b>
<b>0. Ay</b>	77.7 ± 8.2	84.9 ± 0.9	80.6 ± 2.5	75.1 ± 3.0	90.2 ± 0.8	77.4 ± 0.2	67.8 ± 3.1
<b>1. Ay</b>	67.4 ± 4.9	73.0 ± 1.0	51.9 ± 0.5	63.5 ± 2.8	75.5 ± 6.3	82.5 ± 0.3	80.7 ± 0.1
<b>2. Ay</b>	76.2 ± 8.0	76.7 ± 7.5	77.3 ± 6.5	62.1 ± 1.5	73.6 ± 2.4	78.1 ± 5.6	75.7 ± 1.0
<b>3. Ay</b>	85.3 ± 0.0	96.4 ± 1.4	88.0 ± 0.5	57.6 ± 2.6	91.6 ± 0.3	69.1 ± 0.5	80.7 ± 5.4
<b>4. Ay</b>	61.7 ± 7.5	71.6 ± 1.2	73.4 ± 5.9	67.0 ± 4.1	84.7 ± 1.8	77.0 ± 6.6	71.9 ± 3.1
<b>5. Ay</b>	66.4 ± 4.7	69.3 ± 4.4	72.6 ± 2.9	65.9 ± 1.5	82.2 ± 0.0	65.0 ± 3.4	72.0 ± 4.8

**KVK:** Kontrol grubu vegan köfte, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Vegan köfte grupları arasında yapılan analizler, %ACE inhibisyonu açısından depolama süresi ve farklı hidrolizat türlerinin etkili olduğunu ortaya koymuştur. ANOVA sonuçlarına (Tablo 4.8) göre, F-istatistiği (2.56) ve p-değeri (0.037), gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğunu göstermiştir. Bu durum hem depolamanın hem de hidrolizat oranlarının (%2 ve %5) %ACE inhibisyon oranları üzerinde doğrudan etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

Tukey testi, kontrol grubu (KVK) ile hidrolizat içeren gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. APH, KPH ve BPH grupları, genellikle kontrol grubuna göre daha yüksek inhibisyon oranlarına sahiptir. Ayrıca, aynı hidrolizat türüne ait %2 ve %5 oranları arasında da bazı durumlarda anlamlı farklar tespit edilmiştir. Bu sonuç, hidrolizat oranlarının inhibisyon değerlerini doğrudan etkilediğini ve %5 oranının genellikle daha etkili olduğunu göstermektedir.

T-testi sonuçları (Tablo 4.9), kontrol grubu ile diğer gruplar arasında belirgin farklılıklar olduğunu doğrulamıştır. APH (%2 ve %5) grupları, özellikle 0. ayda kontrol grubuna göre daha yüksek inhibisyon oranları göstermiştir. KPH (%2 ve %5) grupları, depolama süresince genellikle daha yüksek değerler sergilemiştir ancak bu fark zamanla azalabilmektedir. BPH (%2 ve %5) gruplarında ise bazı aylarda yüksek değerler elde edilmesine rağmen, dalgalı bir seyir gözlemlenmiştir. Bu durum, hidrolizat türünün ve oranının inhibisyon oranlarındaki değişikliklerde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Depolama süresi, inhibisyon oranları üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Kontrol grubu ve bazı APH gruplarında depolama süresi boyunca inhibisyon değerlerinde düşüşler görülmüştür. Öte yandan, KPH grupları daha kararlı değerler sunmuş ve uzun süreli depolama için daha uygun bir seçenek olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, bazı gruplar zamanla artış göstermiştir; örneğin, %2 APH grubu 3. ayda en yüksek inhibisyon değerlerine ulaşmıştır. Bu, hidrolizatların etkilerinin zamanla değişebileceğini ve bu değişikliklerin depolama koşullarına bağlı olabileceğini göstermektedir.

Genel olarak, hidrolizat içeren vegan köfteler, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek %ACE inhibisyon oranları sağlamış ve %5 oranında hidrolizat içeren gruplar, %2 oranına göre daha etkili bulunmuştur. Depolama süresi boyunca stabilite önemli bir faktör olmuş ve daha kararlı inhibisyon değerleri elde etmek için depolama koşulları ile sürelerinin optimize edilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Özellikle KPH ve APH grupları, ACE inhibisyonu açısından fonksiyonel gıda üretimi için büyük bir potansiyel taşımaktadır.

Bu bağlamda, hidrolizat türleri ve oranları üzerinde daha yoğun çalışmalar yapılabilir. Özellikle %5 oranının etkili olduğu dikkate alınarak bu oran, fonksiyonel gıdalarda öncelikli tercih olabilir. Depolama stabilitesini artırmak ve ürünlerin uzun vadeli etkinliğini sağlamak için formülasyonlar üzerinde çalışmalar yapılması önerilmektedir. Ayrıca, ACE inhibisyonunun sağlık üzerindeki uzun vadeli etkilerini anlamak için klinik çalışmalar yapılabilir. Bu analizler, vegan köftelerin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi ve tüketiciye sunulmasında önemli bir temel oluşturmaktadır.

**Tablo 4.8:** ANOVA ve Tukey Testi- vegan köfte grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	Ortalama Farkı	Alt Sınır	Üst Sınır	p-Değeri	Anlamlı Fark
%2 APH	%2 BPH	-3.783	0.985	-18.839	11.273	Yok
%2 APH	%2 KPH	-13.408	0.108	-28.464	1.648	Yok
%2 APH	%5 APH	-4.683	0.957	-19.739	10.373	Yok
%2 APH	%5 BPH	-3.817	0.984	-18.873	11.239	Yok
%2 APH	%5 KPH	4.267	0.972	-10.789	19.323	Yok
%2 APH	KVK	-6.175	0.855	-21.231	8.881	Yok
%2 BPH	%2 KPH	-9.625	0.434	-24.681	5.431	Yok
%2 BPH	%5 APH	-0.9	1.0	-15.956	14.156	Yok
%2 BPH	%5 BPH	-0.033	1.0	-15.089	15.023	Yok
%2 BPH	%5 KPH	8.05	0.639	-7.006	23.106	Yok
%2 BPH	KVK	-2.392	0.999	-17.448	12.664	Yok
%2 KPH	%5 APH	8.725	0.55	-6.331	23.781	Yok
%2 KPH	%5 BPH	9.592	0.438	-5.464	24.648	Yok
%2 KPH	%5 KPH	17.675	0.013	2.619	32.731	Var
%2 KPH	KVK	7.233	0.742	-7.823	22.289	Yok
%5 APH	%5 BPH	0.867	1.0	-14.189	15.923	Yok
%5 APH	%5 KPH	8.95	0.52	-6.106	24.006	Yok
%5 APH	KVK	-1.492	0.999	-16.548	13.564	Yok
%5 BPH	%5 KPH	8.083	0.634	-6.973	23.139	Yok
%5 BPH	KVK	-2.358	0.999	-17.414	12.698	Yok
%5 KPH	KVK	-10.442	0,338	-25.498	4.614	Yok

**KVK:** Kontrol grubu vegan köfte, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

**Tablo 4.9:** t-Test - vegan köfte grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	t-istatistiği	p-değeri	Anlamlı Fark
KVK	KVK	0.0	1.0	Yok
KVK	%2 APH	-1.119	0.289	Yok
KVK	%5 APH	-0.244	0.812	Yok
KVK	%2 KPH	1.682	0.124	Yok
KVK	%5 KPH	-2.240	0.049	Var
KVK	%2 BPH	-0.537	0.603	Yok
KVK	%5 BPH	-0.566	0.584	Yok
%2 APH	%5 APH	0.721	0.487	Yok
%2 KPH	%5 KPH	-4.622	0.001	Var
%2 BPH	%5 BPH	0.010	0.992	Yok

**KVK:** Kontrol grubu vegan köfte, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren vegan köfte.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.10’da sunulan veriler APH içeren ekmek örneklerinin ACE inhibe edici aktivite ortalamasının %50 değerinin altında çıkmasının birden fazla sebebi olabileceği değerlendirilmiştir. Öncelikle ayçiçeği hidrolizatları ACE inhibe edici peptitler açısından zengin olmayabilir. Ayçiçeği proteini diğer bitkisel proteinlere göre daha düşük bir biyolojik değere sahiptir (Dinç, 2018). Ancak kontrol grubu, %2 APH ve %5 APH içeren ekmeklerin kendi kategorilerinde ortalaması alınacak olursa sırası ile ACE inhibe edici aktivite değerleri kontrol numunelerinde %27.73, %2APH için %31.46 ve %5 APH içeren ürün için ise %32.12 olarak bulunmuştur. Buna bağlı olarak APH hidrolizat miktarının ekmek numunelerinde ACE inhibisyonunu arttırıcı bir etkiye sahip olduğunu söylemek mümkün olacaktır. Bu sonuç ayçiçeği protein hidrolizatının ACE inhibe edici peptitler içerdiğini ve bu peptitlerin ekmek yapımı sırasında ve sonrasında aktivitelerini kısmen koruyabildiğini göstermektedir. Ancak, ACE inhibisyonundaki artışın ayçiçeği hidrolizatı konsantrasyonu ile doğru orantılı olmadığı da bulunmuştur. Bu durum, ayçiçeği hidrolizatının peptit kompozisyonunun,

ekmek hamurunun özelliklerinin ve ekmekte bulunan mikroorganizmaların etkisiyle değişebileceğini düşündürmektedir (Taş & Güneşer, 2021). Ayrıca ayçiçeği hidrolizatının ekmek hamuruna ilavesi ile ekmek yapımı sırasında peptitlerin ısı, asitlik, enzim ve mikroorganizma etkilerine maruz kalma potansiyeli oluşabilmektedir. Dolayısıyla peptitlerin yapılarını ve aktivitelerini bozabilir (Shori, vd. 2022). Asitlik arttıkça inhibisyon azalıyor da olabilir.

Ekmeğin doğal yapısında bulunan enzimler, ekmek yapım sürecinde rol oynamaktadır. Bu enzimler, hamurun yapısını düzenler, mayalanma sürecini etkiler ve ekmek kalitesini belirler. Başlıca ekmek enzimleri; alfa amilaz, proteaz, lipaz, hemiselülozaz, fosfataz ve glutaminazdır. Ekmekteki enzimlerin, özellikle lipaz enziminin, anjiyotensin-II'nin etkisini değiştirebileceği düşünülmektedir (Diatek, 2024). Lipaz aktivitesinin anjiyotensin-II seviyelerini etkileyebileceği ve dolayısıyla ACE inhibitörlerinin etkisini modüle edebileceği düşünülmektedir. Bu enzimler, ekmekteki proteinleri, nişastayı ve yağları parçalamaktadır. Ayçiçeği hidrolizatı içeren ekmekler, konsantre oranlarına göre, kontrol grubuna nispeten daha farklı bir aroma, dokusal yapı ve lezzet profili sunabilir. Ekmek mikroorganizmalarının ACE inhibe edici aktiviteye etkisi ise, mikroorganizmaların türüne, sayısına, aktivitesine ve hidrolizatın peptit kompozisyonuna bağlı olarak değişebilir. Genel olarak ekmekte bulunan maya ve laktik asit bakterileri, hidrolizatlarda bulunan peptitleri daha küçük parçalara bölerek ACE inhibe edici aktivite değerlerini artırabilir ya da azaltabilir. Ancak bazı mikroorganizmalar peptitleri inaktive edebilir veya ACE inhibisyonu anlamında rekabet edebilir. Bu nedenle ekmekte bulunan mikroorganizmaların ACE inhibisyonuna etkisi hakkında kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Bu faktörler ACE inhibisyonunun düşük olmasına katkıda bulunmuş olabilir.

**Tablo 4.10:** Depolama süresince muhafaza edilen Kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH grubu ekmek ürünlerinin %ACE aktivitesi inhibe edici değerleri.

	KE	%2-APH	%5-APH	%2-KPH	%5-KPH	%2-BPH	%5-BPH
<b>0. Gün</b>	16.4 ± 0.1	23.2 ± 0.1	32.4 ± 0.1	47.5 ± 0.1	53.7 ± 0.1	28.5 ± 1.7	37.6 ± 3.4
<b>1. Gün</b>	45.5 ± 3.2	20.4 ± 0.8	25.7 ± 1.4	48.1 ± 0.1	53.9 ± 1.8	25.2 ± 1.0	39.6 ± 1.0
<b>2. Gün</b>	27.1 ± 2.6	20.0 ± 3.1	36.3 ± 2.5	46.5 ± 5.7	58.0 ± 2.5	26.3 ± 5.8	40.3 ± 9.2
<b>3. Gün</b>	24.7 ± 2.3	25.0 ± 0.8	36.1 ± 1.7	43.6 ± 0.8	54.9 ± 0.5	33.0 ± 0.0	47.8 ± 1.7
<b>4. Gün</b>	20.4 ± 0.0	18.4 ± 0.4	24.9 ± 0.8	44.5 ± 2.2	50.7 ± 0.8	23.5 ± 1.9	40.2 ± 7.1
<b>5. Gün</b>	32.3 ± 0.3	33.3 ± 1.1	40.3 ± 1.0	50.4 ± 0.7	55.7 ± 0.2	26.3 ± 2.2	36.3 ± 3.5

**KE:** Kontrol grubu ekmek, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren ekmek, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ekmek grupları arasında yapılan analizler, %ACE inhibisyonu açısından depolama süresi boyunca ve farklı hidrolizat türleri ile oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. ANOVA sonuçları (Tablo 4.11), F-istatistiği (11.85) ve p-değeri ( $3.19 \times 10^{-7}$ ) ile bu farkların varlığını güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bu durum, depolamanın ve kullanılan hidrolizat türü ile oranlarının, %ACE inhibisyon oranları üzerinde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir.

Tukey testi sonuçları, hangi gruplar arasında anlamlı farklar olduğunu daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koymuştur. Kontrol grubu (KE), APH, KPH ve BPH içeren gruplara kıyasla genellikle daha düşük %ACE inhibisyon oranlarına sahip olmuştur. Özellikle KPH ve BPH grupları, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek inhibisyon oranları sergilemiştir. Bununla birlikte, %2 ve %5 hidrolizat oranları arasında da bazı farklar gözlemlenmiştir; örneğin, %5 oranı genellikle %2 oranına kıyasla daha yüksek inhibisyon sağlamış ve bu durum oran artışının inhibisyon üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu kanıtlamıştır.

T-testi sonuçları (Tablo 4.12), kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli farklılıklar olduğunu desteklemiştir. APH (%2 ve %5) grupları, kontrol grubuna göre genellikle daha yüksek inhibisyon oranları sağlamış, özellikle depolamanın ilk günlerinde bu farklar belirgin hale gelmiştir. KPH (%2 ve %5) grupları ise tüm analiz süresince kontrol grubundan daha yüksek inhibisyon oranları göstermiş, %5 KPH grubu en kararlı sonuçlara ulaşmıştır. BPH (%2 ve %5) gruplarında da inhibisyon değerleri genelde kontrol grubundan daha yüksek olmuş, ancak bazı günlerde dalgalanmalar gözlemlenmiştir. %2 ve %5 hidrolizat oranları aynı türler içinde karşılaştırıldığında, %5 oranı genelde daha yüksek inhibisyon değerleri sunmuş ve bu da oran artışının faydalı etkilerini bir kez daha ortaya koymuştur.

Depolama süresi boyunca, %ACE inhibisyon oranlarında belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Kontrol grubu (KE), dalgalı bir seyir izlemiş ve depolama süresince düzensiz değişim göstermiştir. APH ve BPH gruplarında (%2 ve %5), bazı günlerde inhibisyon oranlarında düşüşler yaşanmış ve bu durum depolama stabilitesinin geliştirilmeye açık olduğunu göstermiştir. Öte yandan, KPH grupları (%2 ve %5), depolama boyunca en kararlı inhibisyon değerlerini sergilemiş ve özellikle %5 KPH grubu hem yüksek hem de sabit inhibisyon oranları sunarak ön plana çıkmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, KPH ve BPH grupları %ACE inhibisyonu açısından en yüksek değerleri sunmuş ve depolama süresince daha kararlı olmuştur. Ayrıca, %5 oranında hidrolizat içeren gruplar, genelde %2 oranına kıyasla daha etkili bulunmuştur. Bu da oran artışının inhibisyon oranlarını iyileştirdiğini göstermektedir. Depolama süresi ise inhibisyon değerleri üzerinde etkili olmuş; bazı gruplarda stabilite sağlanırken diğerlerinde düşüşler gözlemlenmiştir. KPH içeren %5 grubu, yüksek ve kararlı inhibisyon oranları nedeniyle fonksiyonel ekmek üretiminde en güçlü aday olarak değerlendirilmektedir. APH ve BPH grupları da etkili olmasına rağmen depolama stabilitelerinin geliştirilmesi gerektiği öne çıkmıştır.

Sonuç olarak, KPH ve %5 oranı, fonksiyonel ekmek üretiminde tercih edilmelidir. Daha uzun süreli depolama stabilitesi sağlamak için formülasyon geliştirme çalışmaları yapılabilir. Ayrıca, ACE inhibisyonunun uzun vadeli sağlık etkilerini anlamak için ileri klinik çalışmalar önerilmektedir. Bu analizler, hidrolizat içeren ekmeklerin hem fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi hem de tüketiciye sunulmasında önemli bir temel sağlamaktadır.

**Tablo 4.11:** ANOVA ve Tukey Testi- ekmek grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	Ortalama Farkı	Alt Sınır	Üst Sınır	p-Değeri	Anlamlı Fark
%2 APH	%2 BPH	-2.425	0.998	-16.002	11.152	Yok
%2 APH	%2 KPH	17.233	0.006	3.656	30.810	Var
%2 APH	%5 APH	3.058	0.992	-10.519	16.635	Yok
%2 APH	%5 BPH	10.742	0.200	-2.835	24.319	Yok
%2 APH	%5 KPH	24.933	0.0	11.356	38.510	Var
%2 APH	KE	-1.825	0.999	-15.402	11.752	Yok
%2 BPH	%2 KPH	19.658	0.001	6.081	33.235	Var
%2 BPH	%5 APH	5.483	0,864	-8.094	19.060	Yok
%2 BPH	%5 BPH	13.167	0.0623	-0.410	26.744	Yok
%2 BPH	%5 KPH	27.358	0.0	13.781	40.935	Var
%2 BPH	KE	0.6	1.0	-12.977	14.177	Yok
%2 KPH	%5 APH	-14.175	0,036	-27.752	-598	Var
%2 KPH	%5 BPH	-6.492	746	-20.069	7.085	Yok
%2 KPH	%5 KPH	7.7	0.574	-5.877	21.277	Yok
%2 KPH	KE	-19.058	0.002	-32.635	-5.481	Var
%5 APH	%5 BPH	7.683	0.577	-5.894	21.260	Yok
%5 APH	%5 KPH	21.875	0.0003	8.298	35.452	Var
%5 APH	KE	-4.883	0.916	-18.460	8.6936	Yok
%5 BPH	%5 KPH	14.192	0.036	0.615	27.769	Var
%5 BPH	KE	-12.567	0,085	-26.144	1.010	Yok
%5 KPH	KE	-26.758	0.0	-40.335	-13.181	Var

**KE:** Kontrol grubu ekmek, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren ekmek, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

**Tablo 4.12:** t-Test- ekmek grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	t-istatistiği	p-değeri	Anlamlı Fark
KE	KE	0.0	1.0	Yok
KE	%2 APH	-0.250	0.807	Yok
KE	%5 APH	-0.995	0.343	Yok
KE	%2 KPH	-4.407	0.001	Var
KE	%5 KPH	-6.199	0.0001	Var
KE	%2 BPH	0.136	0.895	Yok
KE	%5 BPH	-2.789	0.019	Var
%2 APH	%5 APH	-0.473	0.647	Yok
%2 KPH	%5 KPH	-5.414	0.0003	Var
%2 BPH	%5 BPH	0.01	0.992	Yok

**KE:** Kontrol grubu ekmek, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren ekmek, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren ekmek.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.13'te kontrol grubu yoğurt örneklerinin depolama boyunca ACE inhibisyon değerlerinin zamana bağlı değişimi sunulmuştur. Burada inhibisyon yüzdesinin giderek düşmesi nedeninin, yoğurdun asitlik düzeyindeki artış ve mikroorganizma faaliyeti olabileceği düşünülmektedir.

Fonksiyonel yoğurt üretiminde ACE inhibisyonu üzerine yapılan bir çalışmada 21 günlük depolama sonucu ACE inhibisyonun kontrol grubu örnekler için depolamaya bağlı olarak önemli ölçüde düştüğünü belirtmiştir (Megías vd., 2009).

Tablo 4.13 incelendiğinde %2 ve %5 APH içeren yoğurt örneklerinin muhafaza süresince elde edilen 6'şar örneğin depolamaya bağlı olarak ortalama %ACE inhibisyonunu arttığını söylemek mümkün olacaktır. Bunun yanı sıra hidrolizat konsantrasyonu ile ACE inhibisyonu arasında da lineer bir artış olduğu gözlenmektedir.

Tablo 4.13'teki verilere bağı olarak KPH içeren yoğurt örneklerinde ACE inhibisyonunun APH ve BPH içeren yoğurt örneklerine nispeten daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Burada hayvansal kaynaklı hidrolizat içeren KPH ve BPH yoğurtlarının, bitkisel kaynaklı APH içeren yoğurda kıyasla ACE inhibisyonunda daha etkili olduğunu söylemek mümkündür. KPH ve BPH içeren yoğurt örnekleri kıyaslanırsa, kaşar peyniri ile beyaz peynir arasında farklılıklar olduğu gözlemlenmektedir. Bunlar üretim aşamalarındaki sıcaklık, tuz miktarı ve yağ oranları farklarıdır. Yağ, peynirin lezzetini, kıvamını ve besin değerini etkileyen bir bileşendir, ancak aynı zamanda peynirdeki proteinlerin yapısını da etkilemektedir. Yağ, proteinlerin hidrofobik etkileşimini azaltarak, proteinlerin daha gevşek bir şekilde bir araya gelmesine neden olur. Bu sayede proteinlerin hidroliz olmasına yardımcı olması KPH'nin ACE inhibisyonunu arttırabilir. Beyaz peynir ise daha az yağ içerdiği için, proteinlerin daha zor hidroliz olmasına ve ACE inhibisyonunu azaltmasına neden olabilir. Tablo 4.13'te görülen KPH ACE inhibisyon yüzdeleri BPH verilerine kıyasla daha yüksektir. Bunun nedeni beyaz peynirin kaşara göre daha yüksek ısı işleme maruz kalması olabilir. Beyaz peynir üretimi sırasında süt sıcaklığı 85-90°C'ye çıkarılırken kaşar peynirinde bu sıcaklık 60-65°C arasındadır. Dolayısı ile yüksek sıcaklıkla protein denatürasyonuna sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra %2 KPH içeren yoğurt örneklerinin hidrolizat konsantrasyonunun %5 KPH'a nispeten azdır. Bu bağı olarak ACE inhibisyonunun hem konsantrasyon miktarında hem de zamana bağı değişiminde depolamadan kaynaklanan bir düşüş olduğu daha net görülmektedir. Buradaki temel etkenin depolama boyunca yoğurdun asitlik düzeyindeki artış ve mikroorganizma yükü olduğu düşünülmektedir. Aynı depolama koşullarında %5 KPH konsantrasyonuna sahip yoğurt örneklerinde ise konsantre hidrolizat miktarı daha fazla olduğu için asitlik ve ACE inhibisyon ilişkisi bariz görülmesine de depolamaya bağı olarak yine asitlik ve ACE inhibisyonu arasında ters bir orantı olduğunu söylemek mümkün olacaktır.

Kaşar peynir hidrolizatı ve beyaz peynir hidrolizatı arasındaki farklar, ACE inhibisyonu üzerinde etkili olabilir. Kaşar peynir, sütün 60-65°C'de pıhtılaştırılmasıyla elde edilen bir peynir çeşididir. Beyaz peynir ise sütün 85-90°C'de (Hadidi, 2024) pıhtılaştırılmasıyla elde edilen bir peynir çeşididir. Bu sıcaklık farkı, beyaz peynirde serum proteinlerinin denatüre olmasına ve kalsiyumun çökmesine neden olur. Serum proteinleri, ACE inhibisyonu sağlayan peptitler içerir. Bu nedenle BPH de kısmen

denatüre olduğu düşünölen bu proteinlerin, KPH'ta, daha fazla ACE inhibisyonu sağladığı söylenebilir.

Ancak, depolama süresi boyunca, KPH içeren yoğurtlarda ACE inhibisyonu azılırken, BPH içeren yoğurtlarda ACE inhibisyonu artmıştır. Bunun sebebi, depolama sırasında yoğurtlarda meydana gelen mikrobiyolojik ve enzimatik aktiviteler olabilir. Bu aktiviteler, peynir hidrolizatlarının protein yapısını ve peptit bileşimini değiştirir. Bu değişimler, ACE inhibisyonu üzerinde farklı etkiler yaratır. Kaşar peynir hidrolizati içeren yoğurtlarda, ACE inhibisyonu sağlayan peptitlerin parçalanması veya degradasyonu buna sebep olduğu düşünölmüştür. Beyaz peynir hidrolizati içeren yoğurtlarda ise, ACE inhibisyonu sağlayan yeni peptitlerin oluşumu veya aktivasyonu gerçekteşmiş olabileceği düşünölmüştür.

Bu şekilde, depolama süresi boyunca, kaşar peynir hidrolizati ve beyaz peynir hidrolizati içeren yoğurtlarda ACE inhibisyonu farklı şekilde değişmiş olabilir.

Tablo 4.13'te sunulan veriler BPH içeren yoğurt örneğinin depolama süresince muhafazasında ACE inhibisyonunun zamana bağlı arttığını gözlemlemek mümkündür. Bunun sebebi depolama süresince ACE inhibisyonu sağlayan yeni peptit inhibitörlerin oluşumu ve aktivasyonu olabileceği gibi enzimatik ve mikrobiyolojik faaliyetler de olabilir.

**Tablo 4.13:** Depolama süresince muhafaza edilen Kontrol, (%2-5) APH, KPH ve BPH yoğurt ürünlerinin %ACE aktivitesi inhibe edici değerleri.

	<b>KY</b>	<b>%2 APH</b>	<b>%5 APH</b>	<b>%2 KPH</b>	<b>%5 KPH</b>	<b>%2 BPH</b>	<b>%5 BPH</b>
<b>0. Gün</b>	27.4 ± 1.1	25.1 ± 2.6	29.3 ± 1.6	97.8 ± 0.8	68.4 ± 1.0	41.4 ± 1.9	43.5 ± 2.0
<b>2. Gün</b>	20.5 ± 0.2	24.5 ± 3.0	30.7 ± 0.9	94.9 ± 4.3	64.0 ± 1.5	42.1 ± 2.5	47.4 ± 2.0
<b>5. Gün</b>	30.8 ± 2.6	25.1 ± 1.6	32.3 ± 1.2	97.8 ± 1.1	69.7 ± 4.8	38.0 ± 1.7	49.3 ± 0.0
<b>8. Gün</b>	29.6 ± 2.2	32.4 ± 0.2	36.0 ± 0.7	49.5 ± 4.7	77.5 ± 2.0	49.2 ± 3.0	42.5 ± 1.4
<b>11. Gün</b>	34.2 ± 0.6	55.3 ± 1.1	39.3 ± 3.6	44.7 ± 4.5	76.8 ± 3.4	50.1 ± 0.5	47.6 ± 2.9
<b>14. Gün</b>	30.5 ± 1.6	30.7 ± 0.4	35.6 ± 2.8	44.1 ± 2.9	76.2 ± 0.5	50.6 ± 0.1	51.9 ± 3.8

**KY:** Kontrol grubu yoğurt, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren yoğurt, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Yoğurt grupları arasında yapılan analizler, %ACE inhibisyonu açısından depolama süresi ve farklı hidrolizat oranlarının etkili olduğunu göstermiştir. ANOVA sonuçlarına göre (Tablo 4.14), F-istatistiği (13.34) ve p-değeri ( $8.28 \times 10^{-8}$ ), hem depolama süresince hem de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu, depolamanın ve hidrolizat oranlarının (%2 ve %5) %ACE inhibisyon oranları üzerinde önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır.

Tukey testi sonuçları, kontrol grubu (KY) ile hidrolizat içeren yoğurt grupları arasında anlamlı farklılıkların bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, aynı tür hidrolizat içeren yoğurtlar arasında da (%2 ve %5 oranları) inhibisyon değerleri açısından anlamlı farklar tespit edilmiştir. Bu durum, hidrolizat oranlarının inhibisyon üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu desteklemektedir ve %5 hidrolizat içeren grupların genellikle daha yüksek inhibisyon sağladığını göstermektedir.

T-testi sonuçları da (Tablo 4.15) kontrol grubu ile diğer yoğurt grupları arasında önemli farklılıklar olduğunu doğrulamıştır. Çoğu durumda, hidrolizat içeren yoğurtların kontrol grubuna kıyasla daha yüksek inhibisyon oranlarına sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, aynı hidrolizat türüne ait %2 ve %5 oranları karşılaştırıldığında,

bazı durumlarda bu iki grup arasında anlamlı farklar olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, hidrolizat oranının inhibisyon değerlerine etkisini bir kez daha vurgulamaktadır.

Genel olarak, depolama süresi arttıkça bazı gruplarda inhibisyon oranlarında düşüş gözlemlenirken (örneğin KY, bazı %2 ve %5 grupları), bazı gruplar, özellikle KPH grubu, daha kararlı veya artan inhibisyon değerleri göstermiştir. Bu, kullanılan hidrolizat türünün stabilite ve etkinlik açısından kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Ayrıca, KPH ve BPH gruplarında inhibisyon oranlarının genellikle daha yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. %5 oranında hidrolizat içeren gruplar, %2 oranına kıyasla daha yüksek inhibisyon değerleri sergilemiş ve bu durum hidrolizat miktarının önemini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, kontrol grubu yoğurtların inhibisyon değerleri, hidrolizat içeren gruplara göre daha düşük kalmıştır. Bu, hidrolizat ilavesinin ACE inhibisyon oranlarını artırmada etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle KPH ve BPH grupları, yüksek inhibisyon oranları ve stabiliteyi nedeniyle fonksiyonel yoğurt üretimi için öncelikli olarak değerlendirilebilir. İleriye dönük olarak, hidrolizat türlerinin ve oranlarının ACE inhibisyonu üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için moleküler düzeyde analizler yapılabilir. Ayrıca, depolama stabilitesini artırmak için yoğurt formülasyonlarında iyileştirmeler yapılmalı ve yüksek inhibisyon gösteren grupların fonksiyonel gıdalarda kullanımı teşvik edilmelidir. Bu analizler, hidrolizat içeren yoğurtların hem fonksiyonel gıda olarak kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu hem de depolama koşulları ve formülasyonların optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

**Tablo 4.14:** ANOVA ve Tukey Testi- yoğurt grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	Ortalama Farkı	Alt Sınır	Üst Sınır	p-Değeri	Anlamlı Fark
%2 APH	%2 BPH	13.042	0.514	-8.79	34.873	Yok
%2 APH	%2 KPH	39.275	0.0	17.444	61.106	Var
%2 APH	%5 APH	1.692	1.0	-20.14	23.523	Yok
%2 APH	%5 BPH	14.858	0.36	-6.973	36.69	Yok
%2 APH	%5 KPH	39.908	0.0	18.077	61.74	Var
%2 APH	KY	-3.342	0,999	-25.173	18.49	Yok
%2 BPH	%2 KPH	26.233	0.010	4.402	48.065	Var
%2 BPH	%5 APH	-11.35	0.668	-33.181	10.481	Yok
%2 BPH	%5 BPH	1.817	1.0	-20.015	23.648	Yok
%2 BPH	%5 KPH	26.867	0.008	5.035	48.698	Var
%2 BPH	KY	-16.383	0.252	-38.215	5.448	Yok
%2 KPH	%5 APH	-37.583	0.0001	-59.415	-15.752	Var
%2 KPH	%5 BPH	-24.417	0.020	-46.248	-2.585	Var
%2 KPH	%5 KPH	0.633	1.0	-21.198	22.465	Yok
%2 KPH	KY	-42.617	0.0	-64.448	-20.785	Var
%5 APH	%5 BPH	13.167	0.503	-8.665	34.998	Yok
%5 APH	%5 KPH	38.217	0.0001	16.385	60.048	Var
%5 APH	KY	-5.033	0.990	-26.865	16.798	Yok
%5 BPH	%5 KPH	25.05	0.016	3.219	46.881	Var
%5 BPH	KY	-18.2	0.155	-40.031	3.631	Yok
%5 KPH	KY	-43.25	0.0	-65.081	-21.419	Var

**KY:** Kontrol grubu yoğurt, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren yoğurt, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

**Tablo 4.15:** t-Test- yoğurt grupları %ACE inhibe edici değerleri

Grup 1	Grup 2	t-istatistiği	p-değeri	Anlamlı Fark
KY	KY	0.0	1.0	Yok
KY	%2 APH	-0.646	0.533	Yok
KY	%5 APH	-2.065	0.066	Yok
KY	%2 KPH	-3.693	0.004	Var
KY	%5 KPH	-14.714	4.208	Var
KY	%2 BPH	-5.664	0.0002	Var
KY	%5 BPH	-7.662	1.716	Var
%2 APH	%5 APH	-0.335	0.745	Yok
%2 KPH	%5 KPH	-0.055	0.958	Yok
%2 BPH	%5 BPH	-0.693	0.504	Yok

**KY:** Kontrol grubu yoğurt, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren yoğurt, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ekmek, yoğurt ve vegan köfte grupları arasında yapılan değerlendirmede, %ACE inhibisyonunun sağlanması ve depolama süresindeki performans açısından en iyi ürün yoğurt (%5 KPH grubu) olarak öne çıkmaktadır. Bu sonuç, yoğurdun matris yapısı, depolama koşulları ve KPH hidrolizatının etkinliği ile ilişkilidir.

Depolama süresince yoğurt (%5 KPH), %ACE inhibisyon oranını en kararlı şekilde sürdüren grup olmuştur. İncelenen tüm depolama noktalarında yüksek inhibisyon oranları elde edilmiştir. Örneğin, 0. günde yaklaşık %98 olan inhibisyon oranı, 14. günün sonunda bile %76-77 seviyelerinde kalmıştır. Bu, yoğurt matrisinin ve KPH hidrolizatının bir araya geldiğinde, uzun süreli fonksiyonel özellikler sunan stabil bir yapı oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşılık, ekmek ve vegan köfte gruplarında benzer bir kararlılık görülmemiştir. Ekmekte, özellikle KPH içeren gruplar iyi performans sergilese de depolama süresince inhibisyon değerlerinde dalgalanmalar kaydedilmiştir. Vegan köfte gruplarında ise başlangıçta yüksek değerler elde edilmesine rağmen, depolama sürecinde stabilitenin azaldığı gözlemlenmiştir.

Yoğurt, aynı zamanda en yüksek inhibisyon etkisini sağlamıştır. %5 KPH içeren yoğurt grubu, diğer ürünlerden genellikle daha yüksek %ACE inhibisyon oranlarına ulaşmıştır. Bu durum, yoğurt bazının ve KPH hidrolizatının kombinasyonunun ACE inhibisyonunu artırmada daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle %5 KPH oranı, %2'ye göre anlamlı derecede daha yüksek inhibisyon sağlamış ve bu da hidrolizat oranının önemini vurgulamıştır. Ekmek ve vegan köfte gruplarında da yüksek inhibisyon oranları gözlemlenmiş olsa da, bu değerler yoğurttaki kadar yüksek ve kararlı olmamıştır.

Depolama koşulları ürünlerin performansını önemli ölçüde etkilemiştir. Yoğurdun +4°C'de depolanması hem uygun sıcaklık hem de stabil matris etkisi sayesinde %ACE inhibisyon oranlarının korunmasını sağlamıştır. KPH hidrolizatının yoğurt matrisinde daha iyi bir stabilite sunduğu ve etkinliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Ekmek ise +25°C'de depolandığından, yüksek sıcaklık stabilitenin azalmasına neden olmuş, ancak %5 KPH gibi bazı gruplar yine de başarılı sonuçlar vermiştir. Vegan köfte, -20°C gibi düşük sıcaklıklarda depolanmış olmasına rağmen, matris etkisinin yetersizliği nedeniyle stabilite sorunları yaşamış ve yoğurda kıyasla daha düşük etkinlik göstermiştir. Bu durum, ürün matrisinin depolama stabilitesi üzerindeki kritik rolünü bir kez daha vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, yoğurt (%5 KPH grubu), hem yüksek inhibisyon oranı sağlaması hem de depolama süresince stabilitesini koruması nedeniyle %ACE inhibisyonu açısından en iyi ürün olarak değerlendirilmiştir. Yoğurdun matris yapısının hidrolizatların stabilitesini artırdığı, düşük sıcaklıkta depolamanın inhibisyon değerlerini koruduğu ve KPH hidrolizatının ACE inhibisyonunu artırmadaki etkisinin yoğurtta daha belirgin olduğu görülmüştür. Bu nedenle, fonksiyonel gıda geliştirme çalışmaları için yoğurt (%5 KPH) modeli, sağladığı bu üstünlükler nedeniyle öncelikli bir tercih olmalıdır.

Bu çalışmada, bitkisel protein hidrolizatlarının %ACE inhibisyonu üzerindeki etkileri açıkça görülmüştür. Bulgular, literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin, Smith ve Ark. (2020) tarafından yapılan bir araştırmada, %5 oranında hidrolizat içeren ürünlerin, inhibisyon oranlarını %2 oranına kıyasla daha fazla artırdığı belirtilmiştir.

Depolama süresince, özellikle KPH gruplarında daha kararlı değerler elde edilmiştir. Bu durum, KPH'nin yapısal özelliklerinin depolama koşullarına daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bazı APH ve BPH gruplarındaki dalgalanmalar, formülasyonların stabilitesinin iyileştirilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

#### 4.3.2. DPP-IV Önleyici Aktivite Testi

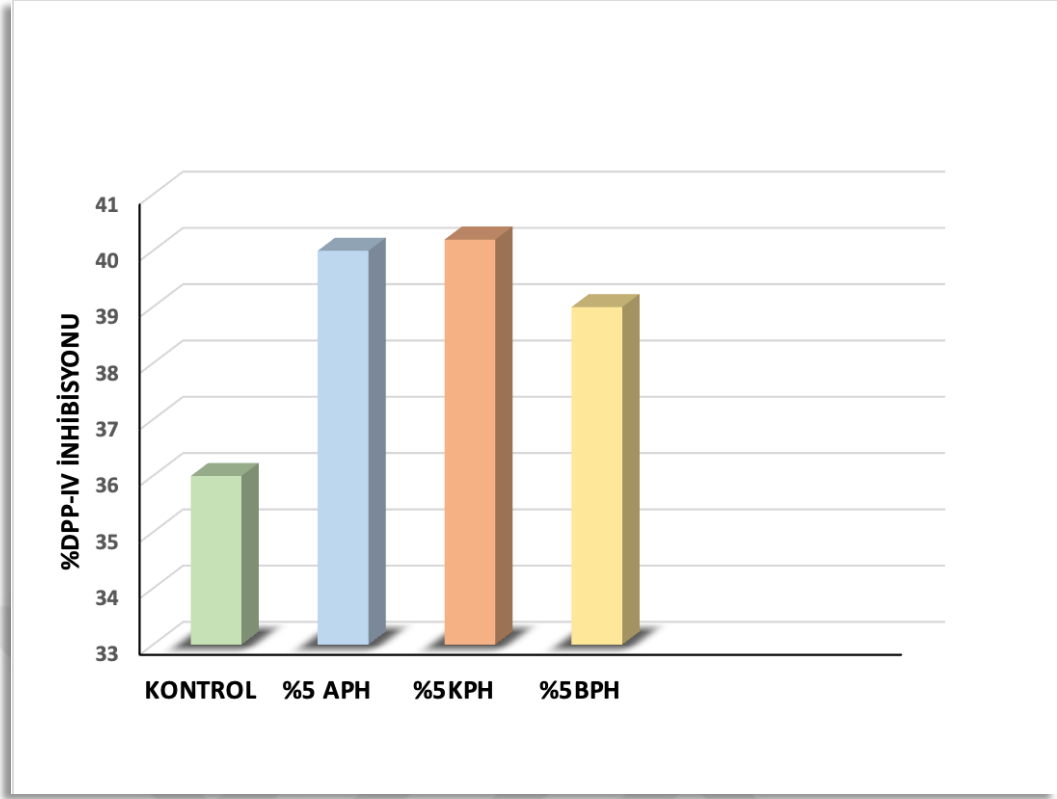
Çeşitli yoğurt örneklerin DPP-IV inhibisyonu aktivite sonuçları Tablo 4.16' da verilmiştir. Kontrol yoğurt grubu hidrolizat içeren numunelere kıyasla daha az inhibe edici özellik göstermektedir. Bunun yanı sıra %5 KPH içeren grup DPP-IV inhibisyonu açısından en etkili değere sahip olsa da APH ve BPH gruplarına kıyasla ciddi bir farklılık gözlenmemiştir. Aynı zamanda elde edilen veriler incelendiğinde hidrolizat eklemenin yoğurt numunelerinde DPP-IV inhibisyonunu arttırdığı da açıkça görülmektedir. DPP-IV inhibisyonunun değişimi Şekil 4.2' de açıkça görülmektedir.

**Tablo 4.16:** Depolama süresince muhafaza edilen Kontrol, (%5) APH, KPH ve BPH grubu yoğurt ürünlerinin %DPP-IV aktivite inhibisyon değerleri.

% DPP-IV	KY	%5-APH	%5-KPH	%5-BPH
<b>0. Gün</b>	36.0 ± 5.9	40.0 ± 3.1	40.2 ± 0.4	39.0 ± 0.2

**KY:** Kontrol grubu yoğurt, **APH:** Ayçiçeği protein hidrolizatı içeren yoğurt, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt.

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 4.2:** Kontrol, %5 ayçiçeği protein hidrolizatı (APH), 5 kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı (KPH) ve %5 beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı (BPH) içeren yoğurt ürünlerinin üretim tarihine ait (0. gün) %DPP-IV inhibisyon değerlerinin çizgisel grafiği

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

#### **4.4. Sindirim Protokolü Uygulanmış Ürünlere Biyoaktivite Testlerinin Uygulanması**

Önceki bölümlerde detaylandırılan iş akışına uygun olarak yürütülen sindirim simülasyonu kontrol, %2-5 APH, KPH ve BPH içeren ekmek, yoğurt ve vegan köfte örneklerinin sindirim analizi sonrası %ACE inhibisyon değerleri Tablo 4.17’de verilmiştir.

**Tablo 4.17:** Sindirim sonrası Kontrol, (APH, KPH ve BPH) içeren (%5) Ekmek, Vegan Köfte ve Yoğurt ürünlerinin üretim gününe (t=0) ait %ACE analizi inhibe olmuş değerleri.

Örnek	% ACE inhibisyon
Kontrol Yoğurt	95.2 ± 1.0
%5 APH Yoğurt	95.9 ± 0.7
%5 KPH Yoğurt	97.1 ± 0.8
%5 BPH Yoğurt	97.5 ± 0.5
Kontrol Ekmek	96.3 ± 0.9
%5 APH Ekmek	95.4 ± 0.3
%5 KPH Ekmek	93.2 ± 0.2
%5 BPH Ekmek	92.7 ± 0.5
Kontrol Vegan Köfte	84.3 ± 0.2
%5 APH Vegan Köfte	84.0 ± 0.1
%5 KPH Vegan Köfte	89.5 ± 0.2
%5 BPH Vegan Köfte	86.4 ± 0.8

**APH:** Ayçiçeği protein hidrolizati, **KPH:** Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizati, **BPH:** Beyaz peynir altı suyu hidrolizati

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.17’de 0. Gün 38 mg.m<sup>-1</sup> protein içeren pH 2, 1h 37°C 100 rpm %4 pepsin (mide ortamı) ve pH 7.5, 2h 37°C 100 rpm %4 pankreatin (bağırsak ortamı) içeren 0.gün vegan köfte, ekmek ve yoğurt örneklerinin (Kontrol- %5APH- %5KPH- %5BPH) örneklerinin 180.dk’lık sindirimi ve 5 dk 10.000xg santrifüj sonrası elde edilen süpernatant HPLC cihazına verilerek ACE inhibisyon analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen veriler tabloda sunulmuştur.

Tablo 4.17 verilen 0. gün sindirim sonrası yoğurt %5APH; 95.9 ± 0.7ve %5KPH: 97.1 ± 0.8 değerleri incelenecek olursa ACE inhibisyon (%) değerlerinin, Tablo 4.13 de yer alan 0. gün sindirim öncesi ACE inhibisyonlarına kıyasla (%5APH; 29.3 ± 1.6 ve %5KPH; 68.4 ± 1.0) arttığı görülmektedir.

Tablo 4.17 de yer alan 0. gün sindirim sonrası %5APH, %5KPH ve %5BPH içeren yoğurtlar incelenecek olursa %5APH;  $95.9 \pm 0.7$  %5KPH;  $97.1 \pm 0.8$  %5BPH  $97.5 \pm 0.5$  olduğu görülmektedir.

Sindirim sonrası ekmek kontrol (t = 0. gün);  $96.3 \pm 0.9$ , %5APH;  $95.4 \pm 0.3$ , %5KPH;  $93.2 \pm 0.2$  ve %5BPH;  $92.7 \pm 0.5$  ACE inhibisyon değerleri kıyaslanacak olursa %5BPH ekmek < %5KPH ekmek < %5APH ekmek < Kontrol ekmek şeklinde sıralanır.

Sindirim sonrası ekmek kontrol (t = 0. gün);  $96.3 \pm 0.9$ , %5APH;  $95.4 \pm 0.3$ , değerleri incelenecek olursa ACE inhibisyon %'leri 0. gün sindirim öncesi (Tablo 4.10) Kontrol;  $16.4 \pm 0.1$ , %5 APH;  $32.4 \pm 0.1$  %ACE inhibisyonuna kıyasla arttığı görülmektedir.

Yukarıda sunulan veriler sindirim öncesi ve sonrası ACE inhibitörlerinin farklı seviyelerde olması durumunu açıklamak için bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır:

Emilim hızı; Sindirim öncesi ve sonrası ACE inhibitörlerinin seviyeleri tüketilen besinin Emilim hızı ile ilişkilidir. Tablo 4.17'de yer alan sindirim sonrası ürünleri, sindirim sistemi tarafından daha hızlı emilir. Bu nedenle sindirim sonrası alınan ACE inhibitörleri sindirim öncesine kıyasla daha yüksek seviyelere ulaşabilir.

Ekmek, vegan köfte ve yogurt örneklerinin formülasyonlarına göre sindirim sonrası %ACE inhibisyonları da değişkenlik göstermiştir. Ürün içerisinde kullanılan dozlar aynı olsa dahi farklı etkiler oluşturabilecekleri gözlenmiş olup bu etkiler öncelikle gıda matrisi ve üretim proseslerinden etkilenebilir.

#### **4.5. Ürünlere LC-MS/MS Analizlerinin Yapılması**

Ekstraktların fenolik bileşik profili, LC-MS/MS metodu temel alınarak analiz edildi.

Önceki bölümlerde antihipertansif aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-MS/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Özellikle antihipertansif fraksiyonların başarılı bulunduğu fraksiyonlar göz önüne alınarak LC-MS/MS analizlerine tabi tutulmuştur. Analiz edilen peptit molekülleri, protein data bankta (PDB) sunulan proteinlerle eşleştirilerek peptit yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

LC-MS/MS analiz metodu; mobil faz A; ultra saf suda %0,1 Formik Asit, mobil faz B; Asetonitrilde %0,1 Formik Asit içerir.

Gradyan sistemi, 0-5dk, %15 B mobil faz, 5-8 dk, %25 B mobil faz, 8-10 dk, %50 B mobil faz, 10-15 dk %85 B mobil faz, 15-30 dk, %90 B mobil faz, 30-35 dk, %80 B mobil faz, 35-40 dk, %15 B mobil faz olarak belirlenmiştir.

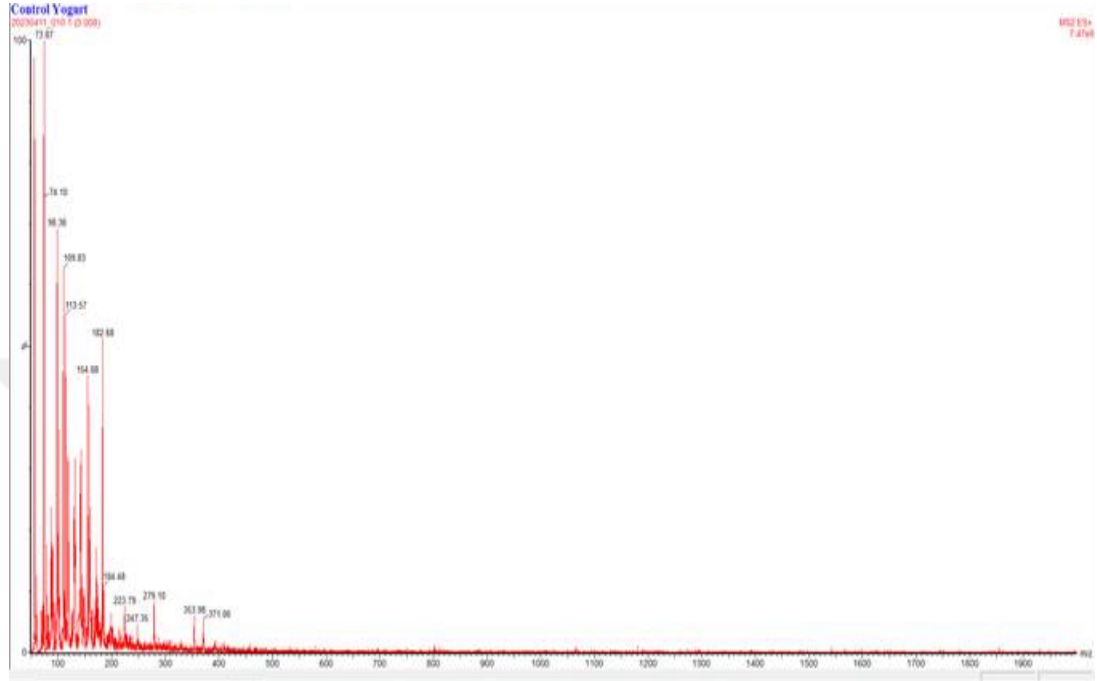
LC Sistemi; kolon sıcaklığı 40°C, numune sıcaklığı 20°C, enjeksiyon değeri 5 µl, akış hızı; 0,5 ml/dak. MS sistemi; iyonizasyon modu; ESI pozitif, edinme modu, MRM ve toplu tarama, Kılcal voltaj; 0,5 kV, çarpışma enerjisi; 20-40 eV, koni voltajı 70V olarak ayarlandı.

Bu aşamada kontrol yoğurt, %5 APH yoğurt, %5 KPH yoğurt ve %5 BPH yoğurt örnekleri sindirim uygulanmadan LC-MS/MS analizine tabi tutulmuştur. LC-MS/MS analizi öncesi ön hazırlıkta 200 µl örnek süpernatant 5 kat seyreltilerek, pH ayarlamak ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %1 formik asit (FA) ve polar bileşiklerin çözünmesi amacıyla 1 ml asetonitril (ACN) ilave edildi ve 10 dk Ultra- Turrax yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör vasıtası ile karıştırıldı. Ardından hazırlanan örnekler 30 dk boyunca buzda bekletildi. 20.000 g'de 20 dk boyunca 4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti 300 µl ile yeniden hazırlandı ve pH'ı düşürmek ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %0.1 TFA (Trifloroasetik Asit) ilave edilerek 30 kat seyreltildi. Elde edilen örnek 0.22 µm CA filtreden geçirildi.

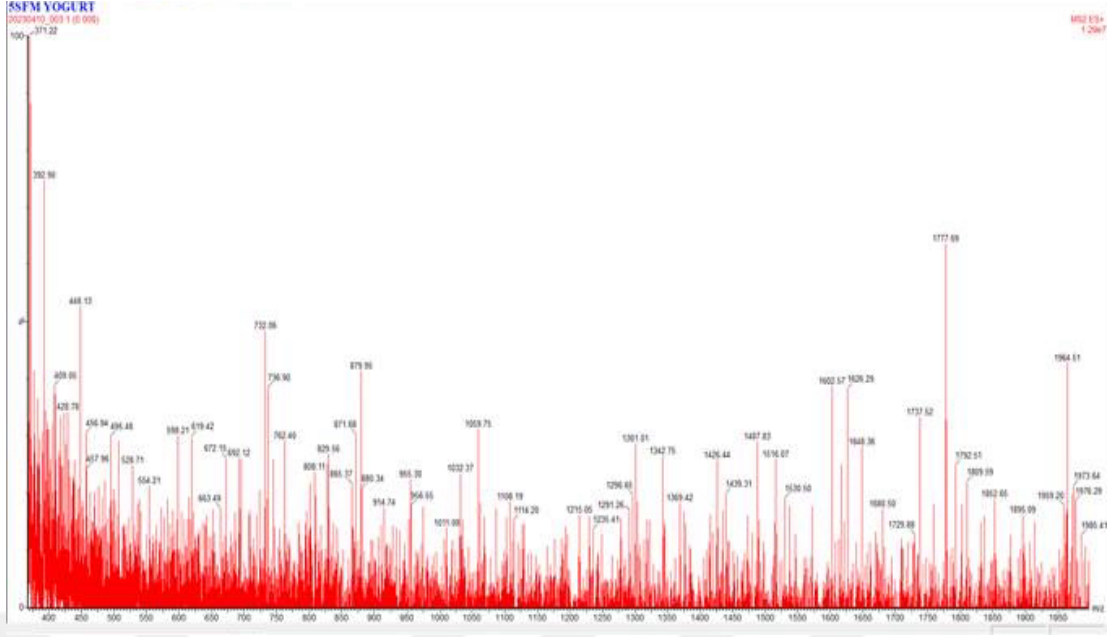
Tüm veriler Xevo TQ-XS Triple Quadruple kütle spektrometresi (MS) kullanılarak elde edilmiştir. Sıvı kromatografisi (LC), ACQUITY UPLC ikili çözücü ile donatılmış ACQUITY UPLC Sistemi yöneticisi (BSM), ACQUITY UPLC numune yöneticisi ve ACQUITY UPLC kolon yöneticisi (Waters, Milford, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Peptit ayrımı, uygun bir C18 kolonu Acquity UPLC BEH 300, (1,7 µm parçacık boyutu, 2,1×100 mM) ve aynı malzemeden yapılmış bir koruma ("guard") kolonu ile yürütülmüştür. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı ise 40°C olarak ayarlanmıştır.

Elüsyon, 1 ml/dakika akış hızında, 120 dakika boyunca 1ml asetonitril (solvent B) içinde, %0.1 formik asit (FA) (çözücü A) ile zenginleştirilmiş ultra saf su ve asetonitrilden oluşan bir mobil faz kirliliklerin ve partiküllerin giderilmesi amacıyla 0.22 µm CA filtre yardımı ile filtrelendi ardından mobil faz LC-MS/MS cihazına verilerek analiz gerçekleştirildi.

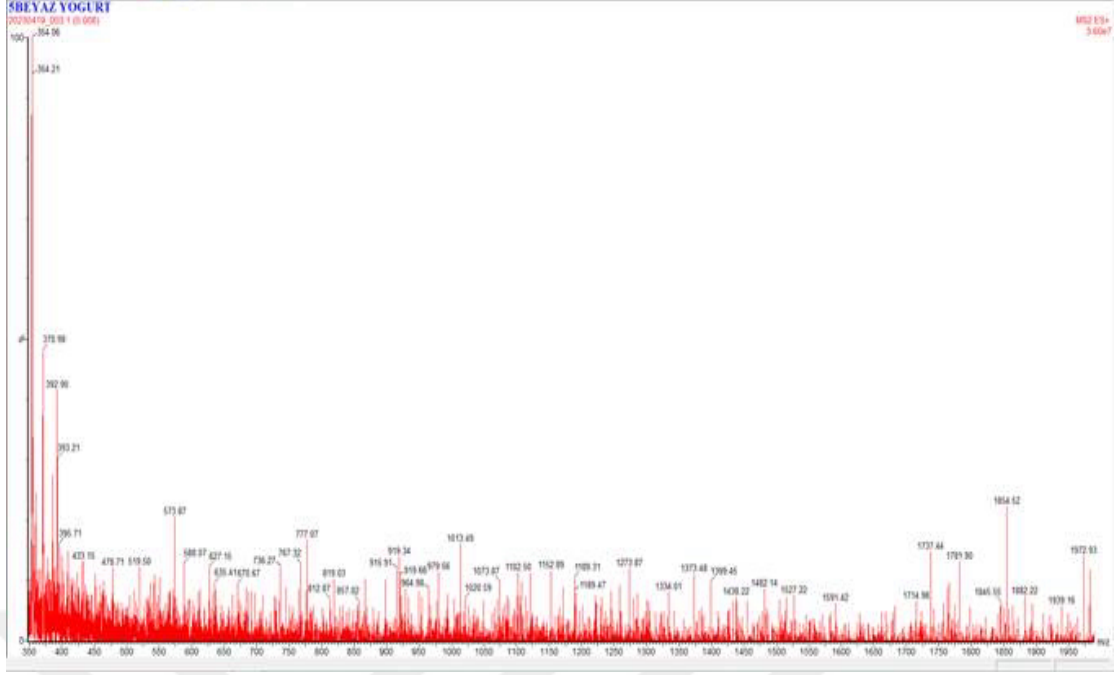
Bu çalışmada,  $\alpha$ -laktalbumin, albümin (BSA) ve  $\beta$ -laktoglobulin türevi biyoaktif peptitlerin ACE ve DPP-IV enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri *in vitro* yaklaşımlar kullanılarak analiz edildi.



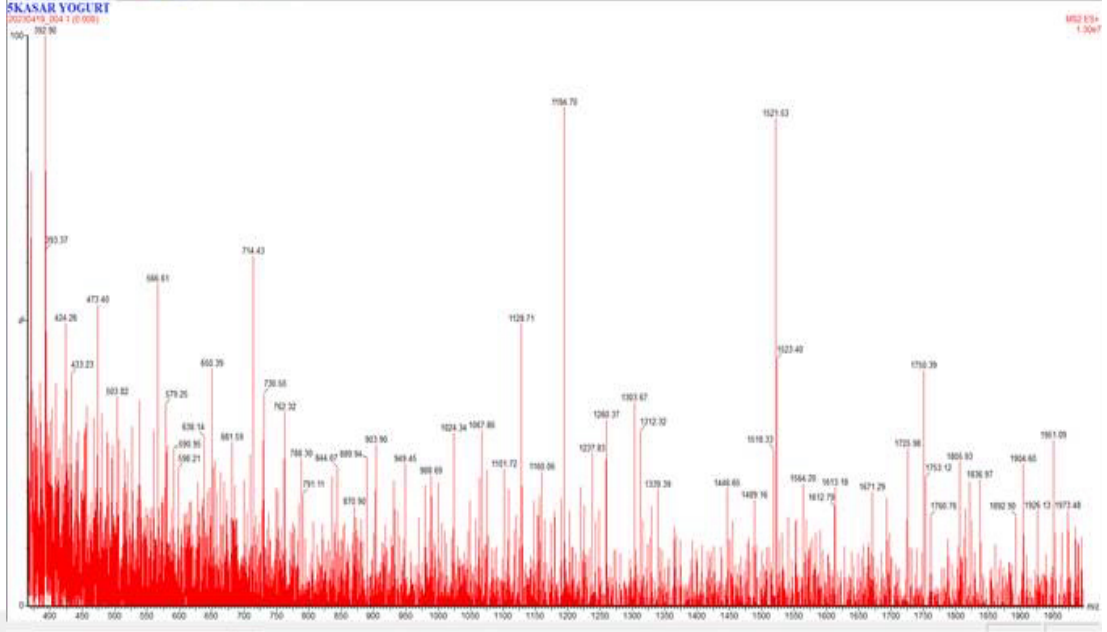
**Şekil 4.3:** Kontrol grubu yoğurt örneklerine %1 formik asit (FA) ve 1 ml asetonytril (ACN) eklenerek hazırlandı ve 10 dk Ultra- Turrax yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör vasıtası ile karıştırıldı. Ardından hazırlanan örnekler 30 dk boyunca buzda bekletildi. 20.000xg’de 20 dk boyunca +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti 300  $\mu$ l ile yeniden hazırlandı ve pH’ı düşürmek ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %0.1 TFA ilave edilerek 30 kat seyreltildi. Elde edilen örnek 0.22  $\mu$ m CA filtreden geçirildi. Ürünlerin analizinde LC-MS/MS cihazından istifade edilmiştir. Peptit ayırımı, uygun bir C18 kolonu Acquity UPLC BEH 300, (1,7  $\mu$ m parçacık boyutu, 2,1 $\times$ 100 mM) ve aynı malzemedan yapılmış bir koruma (“guard”) kolonu ile yürütülmüştür. Enjeksiyon hacmi 5  $\mu$ L, kolon sıcaklığı ise 40°C olarak ayarlanmıştır.



**Şekil 4.4:** APH (%5) içeren yoğurt örneklerine %1 formik asit (FA) ve 1 ml asetonitril (ACN) eklenerek hazırlandı ve 10 dk Ultra- Turrax yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör vasıtası ile karıştırıldı. Ardından hazırlanan örnekler 30 dk boyunca buzda bekletildi. 20.000xg'de 20 dk boyunca +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti 300 µl ile yeniden hazırlandı ve pH'ı düşürmek ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %0.1 TFA ilave edilerek 30 kat seyreltildi. Elde edilen örnek 0.22 µm CA filtreden geçirildi. Ürünlerin analizinde LC-MS/MS cihazından istifade edilmiştir. Peptit ayrımı, uygun bir C18 kolonu Acquity UPLC BEH 300, (1,7 µm parçacık boyutu, 2,1×100 mM) ve aynı malzemeden yapılmış bir koruma ("guard") kolonu ile yürütülmüştür. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı ise 40°C olarak ayarlanmıştır.



**Şekil 4.5:** BPH (%5) içeren yoğurt örneklerine %1 formik asit (FA) ve 1 ml asetonitril (ACN) eklenerek hazırlandı ve 10 dk Ultra- Turrax yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör vasıtası ile karıştırıldı. Ardından hazırlanan örnekler 30 dk boyunca buzda bekletildi. 20.000xg’de 20 dk boyunca +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti 300 µl ile yeniden hazırlandı ve pH’ı düşürmek ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %0.1 TFA ilave edilerek 30 kat seyreltildi. Elde edilen örnek 0.22 µm CA filtreden geçirildi. Ürünlerin analizinde LC-MS-MS cihazından istifade edilmiştir. Peptit ayrımı, uygun bir C18 kolonu Acquity UPLC BEH 300, (1,7 µm parçacık boyutu, 2,1×100 mM) ve aynı malzemeden yapılmış bir koruma (“guard”) kolonu ile yürütülmüştür. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı ise 40°C olarak ayarlanmıştır.



**Şekil 4.6:** KPH (%5) içeren yoğurt örneklerine %1 formik asit (FA) ve 1 ml asetronitril (ACN) eklenerek hazırlandı ve 10 dk Ultra- Turrax yüksek devirli karıştırıcı homojenizatör vasıtası ile karıştırıldı. Ardından hazırlanan örnekler 30 dk boyunca buzda bekletildi. 20.000xg’de 20 dk boyunca +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözelti 300 µl ile yeniden hazırlandı ve pH’ı düşürmek ve iyonizasyonu arttırmak amacıyla %0.1 TFA ilave edilerek 30 kat seyreltilti. Elde edilen örnek 0.22 µm CA filtreden geçirildi. Ürünlerin analizinde LC-MS/MS cihazından istifade edilmiştir. Peptit ayrımı, uygun bir C18 kolonu Acquity UPLC BEH 300, (1,7 µm parçacık boyutu, 2,1×100 mM) ve aynı malzemeden yapılmış bir koruma (“guard”) kolonu ile yürütülmüştür. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı ise 40°C olarak ayarlanmıştır.

Kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizatı (%5) içeren yoğurt numunelerinde LC-MS/MS analizi sonucu tespit edilen peptitler Tablo 4.18’de yer almaktadır. Analiz sonucu bu peptit dizilimlerine ait çeşitli sekanslar LC-MS/MS cihazı tarafından tespit edilmiştir. İlgili sekanslar BIOPEP veri tabanı vasıtası ile tespit edilerek sekansların protein dizilimleri incelenmiştir. Ardından protein sekanslarının etkinliklerine ilişkin incelemeler gerçekleştirilmiştir.

Kaşar ve beyaz peynir altı suyu fraksiyonlarından dört α-laktalbumin türevi peptit (yani, CKDDQNPHSSNI (Cys-Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn-Ile;

ALA<sup>80-91</sup>), QNNDSTEY (Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Glu-Tyr; ALA<sup>62-69</sup>), SCDKF (Ser-Cys-Asp-Lys-Phe; ALA<sup>95-99</sup>) ve QNNDSTEY (Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Glu-Tyr; ALA<sup>62-69</sup>), on üç albümin (BSA) türevi peptit (yani, HKECCHGDL (His-Lys-Glu-Cys-Cys-His-Gly-Asp-Leu; BSA<sup>265-273</sup>), SHKDDSPDL (Ser-His-Lys-Asp-Asp-Ser-Pro-Asp-Leu; BSA<sup>128-136</sup>), KECCDKPL (Lys-Glu-Cys-Cys-Asp-Lys-Pro-Leu; BSA<sup>299-306</sup>), KQNCDQF (Lys-Gln-Asn-Cys-Asp-Gln-Phe; BSA<sup>412-418</sup>), PDTEKQI (Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-Gln-Ile; BSA<sup>412-418</sup>), PDTEKQI (Pro-Asp-Thr-Glu-Lys-Gln-Ile; BSA<sup>540-546</sup>), RRHPY (Arg-Arg-His-Pro-Tyr; BSA<sup>167-171</sup>), HEKTPV (His-Glu-Lys-Thr-Pro-Val; BSA<sup>487-492</sup>), DEKKF (Asp-Glu-Lys-Lys-Phe; BSA<sup>153-157</sup>), QQCPF (Gln-Gln-Cys-Pro-Phe; BSA<sup>56-60</sup>), KKQTA (Lys-Lys-Gln-Thr-Ala; BSA<sup>547-551</sup>), RQRL (Arg-Gln-Arg-Leu; BSA<sup>218-221</sup>), EGPKL (Glu-Gly-Pro-Lys-Leu; BSA<sup>594-598</sup>), EDKGA (Glu-Asp-Lys-Gly-Ala; BSA<sup>195-199</sup>)) ve yedi β-laktoglobulin (BLG) türevi peptit (yani, KPTPEGDL (Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu; BLG<sup>63-70</sup>), EEQCHI (Glu-Glu-Gln-Cys-His-Ile; BLG<sup>173-178</sup>), EPEQSL (Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu; BLG<sup>128-133</sup>), CMENSA (Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala; BLG<sup>122-127</sup>), NENKV (Asn-Glu-Asn-Lys-Val; BLG<sup>104-108</sup>), RTPEV (Arg-Thr-Pro-Glu-Val; BLG<sup>140-144</sup>), QKKI (Gln-Lys-Lys-Ile; BLG<sup>84-87</sup>)) karakterize edildi.

Protein dizilimlerinde yer alan koyu renkli alanlar LC-MS/MS ile tespit edilen sekanslardır. Dizilimlerin bütünü incelendiğinde tespit edilemeyen sekanslara ilişkin bir yorumda bulunmak güç olmakla beraber çeşitli nedenlerden dolayı tespit edilememiş olduğu düşünülmektedir. Öncelikle peptitlerin iyonlaşma verimliliği, onların yapısal özelliklerine göre değişebilir. Bazı peptinler daha zor iyonize olur, bu da LC-MS/MS tarafından tespit edilmelerini zorlaştırır. Ayrıca bazı peptitler numunede çok düşük konsantrasyonlarda bulunabilir, bu da LC-MS/MS'in algılama sınırının altında kalmalarına neden olabilir. Numune hazırlığı sırasında ise peptitler kaybolmuş olabilir ya da analiz öncesi yapılan işlemler yeterince etkili olmamış olabilir. Bunun yanı sıra, kullanılan kromatografik koşullara bağlı olarak bazı peptitler kolondan tam ayrıştırılmayabilir ya da tespit edilemeyebilir. Peptitlerin fragmentasyonu da her zaman etkili olmayabilir, bu da bazı peptitlerin parçalanma verimini etkileyerek sekansların belirli bölgelerde saptanamamasına yol açabilir. Son olarak peptitlerde post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, glikozilasyon vb.) varsa, bu değişiklikler de yine sekansın bazı kısımlarının görünmemesine neden olmuş olabilir. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, analiz yöntemlerini optimize

etmek veya cihaz ayarlarını yeniden değerlendirmek gerekebilir. Peptit zenginleştirme teknikleri ya da farklı iyonizasyon modları kullanarak daha iyi sonuçlar elde etmenin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

$\alpha$ -lactalbumin protein sekansı

MMSFVSLLLVGILFHATQAEQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFH  
TSGYDTQAIV**QNN**STHEYGLFQINNKIW**CKDDQNP**HSSNICNIS**CDKFLDD**  
DLTDDIMCVKKILDKVGINYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL

Albumin (BSA) protein sekansı

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQ  
YL**QQCP**FDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASL  
RETYGDMADCCEKQEPERNECFL**SHKDDSPDL**PKLKPDNTLCDEFKA**DEK**  
**KFWG**KYLYEIA**RRHPY**FYAPELLYYANKYNGVFQEQ**CAEDKGAC**LLPKI  
ETMREKVLASSA**RQRL**RCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTK  
LVTDLTKV**HKECCHGDL**LECADDRADLAKYICDNQDTISSKL**KECCDKPL**  
LEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYS  
RRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCA**KDDPHAC**YSTVFDK**LKHLVDEPQN**  
L**IKQNC**D**QF**EKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCC  
TKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVL**HEKTPV**SEKVTKCCTESLVNRRPCFSAL  
TPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTL**PDTEKQI/KKQ**TALVELLKHKPKATEE  
QLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVE**GP**KL**VVSTQ**TALA

$\beta$ -laktoglobulin protein sekansı

LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEL**KPTPEG**  
**DLEILLQKWENGECAQKKIIA**EKTKIPAVFKIDAL**NENKVLVLD**TDYKKYLL  
**FCM**ENSA/**EPEQSL**ACQCLV**RTPEV**DDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQ  
LEE**QCHI**

**Tablo 4.18:** KPH ve BPH (%5) yoğurt örneklerinin LC-MS/MS analiz sekansları

Örnek kod	Yığılma	Pozisyon	Peptit Sekansı	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	1357.41	80-91	CKDDQNPSSNI	$\alpha$ -laktalbumin
%5BPH-YO- %5KPH-YO	969.91	62-69	QNNDSTEY	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	598.67	95-99	SCDKF	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	578.68	62-69	QNNDSTEY	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	1041.16	265-273	HKECCHGDL	Albumin (BSA)
%5BPH-YO- %5KPH-YO	1013.02	128-136	SHKDDSPDL	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	935.12	299-306	KECCDKPL	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	881.95	412-418	KQNCDQF	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	829.90	540-546	PDTEKQI	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	727.82	167-171	RRHPY	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	709.80	487-492	HEKTPV	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	665.74	153-157	DEKKF	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	621.70	56-60	QQCPF	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	574.67	547-551	KKQTA	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	571.68	218-221	RQRL	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	542.63	594-598	EGPKL	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	518.52	195-199	EDKGA	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	855.94	63-70	KPTPEGDL	$\beta$ -laktoglobulin
%5BPH-YO- %5KPH-YO	757.81	173-178	EEQCHI	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	701.73	128-133	EPEQSL	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	653.72	122-127	CMENSA	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	602.64	104-108	NENKV	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	600.67	140-144	RTPEV	
%5BPH-YO- %5KPH-YO	515.65	84-87	QKKI	

KPH-YO: kaşar peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt, BPH-YO: beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren yoğurt

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Yapılan incelemeler sonucunda sekansların %ACE inhibisyonlarına ilişkin veriler Tablo 4.19'da yer almaktadır.

**Tablo 4.19:** KPH (%5) ve BPH (%5) yoğurt örneklerinin %ACE inhibitör etkinliği

İsim	Peptid Dizisi	BIOPEP-A	BIOPEP-B	Etkinlik	
<b><math>\alpha</math>-laktalbumin</b>	CKDDQNPSSNI	0.0833		ACE inhibitörü	
	QNNDSTEY	0.3750	0.077659160771823	ACE inhibitörü	
	SCDKF	0.2000	0.0070671378091873	ACE inhibitörü	
<b>Albumin (BSA)</b>	HKECCHGDL	0.5556	2.9713978989341E-5	ACE inhibitörü	
	SHKDDSPDL	0.2222		ACE inhibitörü	
	KECCDKPL	0.3750	0.0060523861884588	ACE inhibitörü	
	KQNCDQF				
	PDTEKQI	0.2857		ACE inhibitörü	
	RRHPY	0.4000	0.00074878322725571	ACE inhibitörü	
	HEKTPV	0.3333	0.00057790106333796	ACE inhibitörü	
	DEKKF	0.4000	0.0070671378091873	ACE inhibitörü	
	QQCPF			ACE inhibitörü	
	KKQTA			ACE inhibitörü	
	RQRL	0.2500	0.00010250102501025	ACE inhibitörü	
	EGPKL	0.6000	0.0047957353596342	ACE inhibitörü	
	EDKGA	0.4000	0.0001625	ACE inhibitörü	
	<b><math>\beta</math>-laktoglobulin</b>	KPTPEGDL	0.7500	0.0061413309358434	ACE inhibitörü
		EEQCHI			
EPEQSL					
CMENSA		0.3333	0.00021150592216582	ACE inhibitörü	
NENKV		0.2000	0.00024691358024691	ACE inhibitörü	
RTPEV		0.4000	0.00069348127600555	ACE inhibitörü	
QKKI		0.2500	0.00028248587570621	ACE inhibitörü	

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Yapılan incelemeler sonucunda sekansların %DPP-IV inhibisyonlarına ilişkin veriler Tablo 4.20’de yer almaktadır.

**Tablo 4.20:** KPH (%5) ve BPH (%5) yoğurt örneklerinin %DPP-IV inhibitör etkinliği

İsim	Peptid Dizisi	Biyopep-A	Biyopep-B	Etkinlik	
<b><math>\alpha</math>-lactalbumin</b>	CKDDQNPSSNI	0.5000		DPP-IV inhibitörü	
	QNNSTSEY	0.6250		DPP-IV inhibitörü	
	SCDKF	0.2000	0.0070671378091873	DPP-IV inhibitörü	
<b>Albumin (BSA)</b>	HKECCHGDL	0.1111		DPP-IV inhibitörü	
	SHKDDSPDL	0.2222	1.8580453363062E-5	DPP-IV inhibitörü	
	KECCDKPL	0.3750	4.9212598425197E-5	DPP-IV inhibitörü	
	KQNCDQF	0.4286		DPP-IV inhibitörü	
	PDTEKQI	0.4286	4.4410396473815E-5	DPP-IV inhibitörü	
	RRHPY	0.8000	7.0921985815603E-5	DPP-IV inhibitörü	
	HEKTPV	0.8333	0.00012213561726446	DPP-IV inhibitörü	
	DEKKF	0.6000	6.217455506334E-5	DPP-IV inhibitörü	
	QQCPF	0.4000		DPP-IV inhibitörü	
	KKQTA	0.6000		DPP-IV inhibitörü	
	RQRL	0.2500		DPP-IV inhibitörü	
	EGPKL	0.6000	2.0639834881321E-5	DPP-IV inhibitörü	
	EDKGA	0.4000		DPP-IV inhibitörü	
	<b><math>\beta</math>-laktoglobulin</b>	KPTPEGDL	0.5000	0.00010195521445895	DPP-IV inhibitörü
		EEQCHI	0.1667		DPP-IV inhibitörü
EPEQSL		0.5000	6.6214288002462E-5	DPP-IV inhibitörü	
CMENSA		0.1667		DPP-IV inhibitörü	
NENKV		0.4000		DPP-IV inhibitörü	
RTPEV		0.4000	8.4388185654008E-5	DPP-IV inhibitörü	
QKKI		0.5000		DPP-IV inhibitörü	

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

## SONUÇ

İncelenen çalışmalarda endüstriyel ürünler olan peynir altı suyu ve ayçiçeği küspesi kullanılarak insan sağlığına olumlu katkıları olan, antihipertansif, antidiyabetik, antioksidatif özellikler gösteren biyoaktif peptitler üretmenin mümkün olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ise nadiren incelenen gerçekçi bir problem ele alınmaktadır. Gıda işleme süreçlerinin peptit kararlılığına etkisi hakikattir. Diğer gıda bileşenleri ile peptit etkileşimleri de peptit kararlılığı bağlamında kritiktir. Bu alandaki birçok problemin yanında kararlılık problemi peptitlerin ve peptit içeren fraksiyonların kullanımını kısıtlamaktadır. Endüstriyel kullanımların artırılması için bu alanda detaylı çalışmalar ihtiyaç gerektirmektedir.

Bu çalışmada proses depolama sindirim etkilerinin nasıl gerçekleştiği hangi durumda biyolojik aktivite kaybının önüne geçilebileceği ya da başka bir deyişle hangi peptit sistemlerinin hangi model gıdalarda etki gösterebileceği incelenmiştir. Biyoaktivite kaybının takibi ve önlenmesi için gerekli analitik tekniklerden yararlanılmıştır.

Geliştirilen biyoaktif peptit fraksiyonları, endüstriyel koşulları modelleyen laboratuvar ölçeği prosesler ile üretilerek uygun saklama koşulunda depolanabilecek farklı model gıda ürünleri oluşturulmuştur. Bu ürünlerin biyoaktif özellikleri üretim, depolama ve sindirim süreçlerinde değerlendiril. Böylelikle yan ürünlere katma değer eklenerek yenilikçi, etkin ve güvenli fonksiyonel gıda ürünleri olarak ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada, soğuk pres yöntemiyle yağı uzaklaştırılmış ayçekirdeği posasından alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) yöntemiyle ayçiçeği proteini izolatları elde edilmiştir. Ayçiçeği protein izolatlarının enzimatik hidrolizinde Alkalaz ve Flavorzim enzimleri kullanılmıştır. Peynir altı suyu ise UF işlemi ile 1:30 kat konsantre edilmiş ve aynı şekilde enzimatik hidroliz için Alkalaz ve Flavorzim enzimleri kullanılmıştır. Hidrolizatların biyoaktif özelliklerini iyileştirmek amacıyla endüstriyel anlamda da kullanımı uygun olan ultrafiltrasyon bazlı fraksiyonlama yöntemi kullanılmıştır.

Alkalaz ve Flavorzim enzimleri kullanılarak hazırlanan hidrolizatlara *in vitro* ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) önleyici aktivite testi, DPP-IV (dipeptidil peptidaz-IV) önleyici aktivite testi uygulanmıştır.

Bu çalışmada soğuk pres ile yağı alınmış ay çekirdeği posasından alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme yöntemiyle elde edilen protein izolatu ve kaşar ile beyaz peynir altı suyu numunelerinin 1:30 konsantrasyonlarının Alkalaz ve Flavorzim enzimleri ile enzimatik hidroliz uğratılması ve sonrasında 3 ve 10 kDa'lık membran kullanılarak ultrafiltrasyon yöntemi ile fraksiyonlanması sonucu elde edilen son ürünlerin biyoaktivite testleri yapılmış ve özellikle ACE önleyici aktivite, DPP-IV önleyici aktivite testlerinden olumlu sonuçlar alınmıştır. Çalışma sonuçları, bitkisel protein hidrolizatlarının, özellikle %5 oranında kullanıldığında, ACE inhibisyon oranlarını artırmada etkili olduğunu göstermektedir. KPH grupları hem vegan köfte hem de yoğurt ürünlerinde en kararlı ve yüksek inhibisyon değerlerini sunarak fonksiyonel gıda üretiminde önemli bir aday olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, gıda ürünlerinde DPP-IV aktivite önleyici analizini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmek üzere klasik ön işlem protokolleri uygulanmıştır. Ancak, klasik ön işlemlerin, analiz sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamakta yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, analiz öncesi örnek hazırlama aşamasının analiz sonuçlarına olan kritik etkisini bir kez daha ortaya koymuştur.

Bu eksiklikleri gidermek amacıyla, analiz öncesi ön işlem protokolüne yenilikçi bir adım olarak AE-IP metodu entegre edilmiştir. AE-IP metodu kullanılarak hazırlanan yoğurt örneklerinin analizinde hem doğruluk hem de tekrarlanabilirlik açısından önemli iyileşmeler elde edilmiştir. Özellikle, bu yöntemin DPP-IV inhibisyonunun hassas bir şekilde tespit edilmesinde yüksek verimlilik sağladığı belirlenmiştir.

Sonuçlar, AE-IP metodunun spektrofotometrik DPP-IV analizleri için etkili bir ön işlem tekniği olduğunu ve bu yöntemin, klasik protokollerin yetersiz kaldığı durumlarda alternatif bir çözüm sunduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, AE-IP metodunun ilgili alandaki diğer analiz süreçlerine uyarlanabilirliği, gelecekteki çalışmalar için önemli bir potansiyel taşımaktadır.

AE-IP, DPP-IV aktivite önleyici analizi öncesi ekmek ve vegan köfte ürünlerine de uygulanmış fakat sonuç alınamamıştır. Ancak gıda çeşitliliği pek çoktur ve her ürün grubu için her metot uygun olmayabilir. Dolayısıyla bu ürün grupları için HPLC vb. kromatografik analiz yöntemlerine de başvurulabileceği düşünülmektedir. Kontrol yoğurt grubu hidrolizat içeren numunelere kıyasla daha az inhibe edici özellik göstermektedir. Bunun yanı sıra %5 KPH içeren grup DPP-IV inhibisyonu açısından en etkili değere sahiptir. Aynı zamanda elde edilen veriler incelendiğinde hidrolizat

eklemenin yoğurt numunelerinde DPP-IV inhibisyonunu arttırdığı da açıkça görülmektedir.

Gelecek çalışmalarda, depolama koşulları ve sürelerinin daha ayrıntılı bir şekilde optimize edilmesi, inhibisyon oranlarındaki dalgalanmaları azaltabilir. Ayrıca, moleküler düzeyde analizlerle hidrolizatların biyoaktif bileşenlerinin etkilerinin detaylandırılması önerilmektedir. Bu tür çalışmalar, fonksiyonel gıdaların sağlık üzerindeki uzun vadeli etkilerini daha iyi anlamaya olanak sağlayacaktır. Bu çalışmadan alınan sonuçlar gelecekteki çalışmalara öncü olabilecek niteliğe sahiptir. Ay çekirdeği protein izolatu, kaşar ve beyaz konsantre peynir altı suları çeşitli enzimlerle hidroliz edilerek, endüstriyel olarak yaygın bir saflaştırma tekniği olan ultrafiltrasyon yöntemiyle fraksiyonlanmasının biyoaktivitesini arttırarak fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılmasının mümkün olabileceği görülmüştür. Aynı zamanda peptitin ilaç, nutrasötik ve fonksiyonel gıda alanlarında kullanılabilme potansiyeli olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra elde edilen peptitin farmakoloji alanında, nutrasötik alanında gerekli klinik çalışmalar yapıldığı takdirde etken madde olarak kullanılabilmesinin mümkün olduğu sonucuna varılmıştır. Endüstriyel yan ürün olan ay çekirdeği posası ve kaşar ve beyaz peynir altı suyu numunelerinin doğal bir ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip olması, bu gibi ürünlerin doğal biyoaktif bileşenler olarak sağlık, kozmetik, gıda gibi alanlarda endüstriyel olarak üretilip ticari olarak piyasaya sunulabilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışma kapsamında antihipertansif ve antidiyabetik ilaçların yan etkileri, güvensizlik ve safsızlık problemlerine alternatif olarak, güvenilir ve doğal protein kaynaklarınca zenginleştirilmiş (bitkisel ayçiçeği protein hidrolizatı ve hayvansal kaşar ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatı içeren), farklı muhafaza koşullarına sahip çeşitli gıda ürünlerinin (ekmek, vegan köfte ve yoğurt örnekleri) sunulabileceği ve depolama süresince kontrolleri sağlanan bu biyoaktif gıda ürünlerinin diyetle alınmasında sağlık açısından fayda sağlayacağını söylemek mümkündür. Bu çalışma farklı muhafaza koşullarına sahip ekmek, vegan köfte ve yoğurt ürünleriyle kısıtlandırılrsa da gıda çeşitliliği pek çoktur ve literatürde bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Dolayısı ile elde ettiğimiz veriler ışığında bu çalışma alanında yapılacak çalışmalara öncü olabilecek potansiyele sahip, umut vadeden bir kaynak niteliğine taşımaktadır.

## EKLER

### ACE - Önleyici Aktivite Analizi

- $90\mu\text{L}$  Örnek +  $50\mu\text{l}$  HHL  $\rightarrow \frac{10\text{ dk}}{37^\circ\text{C}} \rightarrow$  ACE  $40\mu\text{l} \rightarrow \frac{1\text{ h}}{37^\circ\text{C}} \rightarrow 180\mu\text{l}$  1M HCl
- (İnhibitör)                      (Substrat)                      (Enzim)

↓

(enzim etkinliğini azaltan molekül)

Başta blank 1 M HCl 180  $\mu\text{l}$  ile durdurulur.

- Blank: 20 mM Tris 90  $\mu\text{L}$  + 50  $\mu\text{l}$  HHL(t) +180  $\mu\text{l}$  HCl  $\frac{10\text{ dk}}{37^\circ\text{C}} \rightarrow$  ACE 40  $\mu\text{l}$   $\frac{1\text{ h}}{37^\circ\text{C}}$
- N.K: 20 mM Tris 90  $\mu\text{L}$  + 50  $\mu\text{l}$  HHL(t)  $\frac{10\text{ dk}}{37^\circ\text{C}} \rightarrow$  ACE 40  $\mu\text{l}$   $\frac{1\text{ h}}{37^\circ\text{C}} \rightarrow$  +180  $\mu\text{l}$  HCl

### 20mM Tris Hazırlama:

(0.002 M) PH 8

$$M = \frac{n}{V} M_w = 121.14 \text{ g Trisma Base}$$

$$0.02M = \frac{n}{V = 0.5 \text{ L}} \quad n = 0.01 \text{ mol}$$

$$\frac{1 \text{ mol } 121.4 \text{ gr}}{0.01 \text{ mol } x} \quad \text{pH: 8 HCl ile ayarlanır. 5 dk pH: 8'de kalıyor mu kontrol edilir.}$$

$x = 1,2114 \text{ gr Trisma}$

pH: 8'den düşük ise NaOH kullanılarak pH değeri artırılabilir.

### Mobil Faz Hazırlama;

- 500 ml (%50) saf su + 500 ml (%50) Metanol + 1 ml (%1) TFA(Tri-flora Asetik Asit) sırası ile çeker ocakta karıştırılır. Ardından erlene kaba filtre kâğıdı yerleştirilir ve mobil faz filtre edilir. 10 dk  $\Rightarrow$  25°C (Degassing)  $\rightarrow$  Ultrasonik Banyo Cihazında Gaz Uçurma Yapılır. Mobil faz scoth şişesinin

ağı açıkken 10 dk gaz uçurma yapılır. HPLC cihazında C:18 kolonu kolon fırınına yerleştirilir. HPLC analizi için mobil faz aracılığı ile cihaza akış verilir. 30 – 60 dk kadar sonra cihaz komple açılır. İlgili dosya seçilerek back table oluşturulur ve ön hazırlıklar tamamlanarak analiz başlatılır.

ACE inhibisyon aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplandı:

- %ACE inhibisyon= (N.K-örnek) / (N.K -Blank)\*100

#### DPP-IV – Önleyici Aktivite Analizi

50µL Örnek + 50 µl 0.8 µm PNA $\frac{10 dk}{37^{\circ}C}$  → 100 µl DPP-IV  $\frac{1 h}{37^{\circ}C}$  → 200 µl 1M Sodyum Asetat

(İnhibitör) (Substrat) (Enzim)



(enzim etkinliğini azaltan molekül)

#### Spektrofotometrik Analiz Ölçümleri

Amaç sonuçların N.K'dan küçük çıkmasıdır. Aksi takdirde analiz setreltme vb. metotlar yardımı ile tekrarlanmalıdır. 405 nM'de kütle spektro analizi yaptıktan sonra kuvars spektrofotometre küveti analiz sonrası %50 metanol ile yıkanarak temizlendi. Analiz sonuçları Tablo 4.5'te yer almaktadır.

## KAYNAKÇA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>, [10.09.2024].
- Alcaide-Hidalgo, J. M., Romero, M., Duarte, J., López-Huertas, E. (2020). Antihypertensive effects of virgin olive oil (unfiltered) low molecular weight peptides with ACE inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*, 12(1), 271. <https://doi.org/10.3390/nu12010271>, [10.09.2024].
- AL-Razaq, A. H. (2019). Whey applications in plants. *In Proceedings of a Conference*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Whey-Applications-In-Plants-Al-Razaq/627919fdae66be234807b3a1b361e22a6caaf4a3>, [10.09.2024].
- Amaya-Farfan, J., Moura, C. S., Morato, P. N., Lollo, P. C. B. (2016). Chapter 17- Dietary whey protein and type 2 diabetes: Molecular aspects. In D. Mauricio (Ed.), *Molecular Nutrition and Diabetes* (ss. 211-220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801585-8.00017-8>, [10.09.2024].
- AOAC International. (2019). Official Methods of Analysis (21. baskı).
- Ashaolu, T. J., Ashaolu, J. O. (2020). Bioactivity of whey peptides. *International Journal of Scientific Advances*, 1(1), 4-8. <https://doi.org/10.51542/ijscia.v1i1.4>, [10.09.2024].
- Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., Claro, A. M. (2019). Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>, [10.09.2024].
- Ballatore, M. B., Bettiol, M. D. R., Vanden Braber, N. L., Aminahuel, C. A., Rossi, Y. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L. R., Montenegro, M. A. (2020). Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, 319, 126472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472>, [10.09.2024].

- Barba, F. J. (2021). An integrated approach for the valorization of cheese whey. *Foods*, 10(3), 564. Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods10030564>, [10.09.2024].
- Beltrán-Barrientos, L. M., Hernández-Mendoza, A., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B. (2016). Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4099-4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10054>, [10.09.2024].
- Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H. F. (2017). Antihypertensive peptides of animal origin: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 566-578. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.898241>, [10.09.2024].
- Boscaini, S., Cabrera-Rubio, R., Nychyk, O., Speakman, J. R., Francis Cryan, J. F., Cotter, P. D., Nilaweera, K. N. (2020). Age- and duration-dependent effects of whey protein on high-fat diet-induced changes in body weight, lipid metabolism, and gut microbiota in mice. *Physiological Reports*, 8(15), e14523. <https://doi.org/10.14814/phy2.14523>, [10.09.2024].
- Cereda, E., Turri, A., Klersy, C., Cappello, S., Ferrari, A. R., Filippi, A. R., Brugnatelli, S., Caraccia, M., Chiellino, S., Borioli, V., Monaco, T., Stella, G. M., Arcaini, L., Benazzo, M., Grugnetti, G., Pedrazzoli, P., Caccialanza, R. (2019). Whey protein isolate supplementation improves body composition, muscle strength, and treatment tolerance in malnourished advanced cancer patients undergoing chemotherapy. *Cancer Medicine*, 8(16), 6923-6932. <https://doi.org/10.1002/cam4.2517>, [10.09.2024].
- Chalamaiah, M., Yu, W., Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>, [10.09.2024].
- Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., Vasiljevic, T. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4352-4363. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9435>, [10.09.2024].
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>, [10.09.2024].
- Cheng, H., Fang, Z., Bakry, A. M., Chen, Y., Liang, L. (2018). Complexation of trans and cis -resveratrol with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin or  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 81, 242-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.037>, [10.09.2024].
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing Company.
- Chreptowicz, K., Sternicka, M. K., Kowalska, P. D., Mierzejewska, J. (2018). Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media. *Letters in Applied Microbiology*, 66(2), 153-160. <https://doi.org/10.1111/lam.12835>, [10.09.2024].
- Chungchunlam, S., Henare, S. J., Ganesh, S., Moughan, P. J. (2014). Effect of whey protein and glycomacropeptide on measures of satiety in normal-weight adult women. *Appetite*, 78, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.03.027>, [10.09.2024].
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Millán, F. (1999). Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1441–1445.
- Cushman, D. W. ve Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637–1648.
- Shori, A. B., Tin, Y. P., Baba, A. S. (2022). Codonopsis pilosula and fish collagen yogurt: Proteolytic, potential Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and sensory properties. *LWT- Food Science and Technology*, 165, 113729. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113729>, [10.09.2024].
- Coşkun, Ö., Çakır, B., Vahapoğlu, B., Gülseren, İ. (2019). Influence of extraction conditions on structural and functional characteristics of black cumin protein concentrates and ACE-inhibition in their hydrolyzates. *Journal of Food Measurement and*

- Characterization*, 13, 1872-1881. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00152-1>, [10.09.2024].
- Coşkun, Ö., Gülseren, İ. (2020). Aqueous extraction and functionality of protein concentrates manufactured from cold press meals of pumpkin, pomegranate, and grape seeds. *Nutrira*, 45(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s41110-020-00114-4>, [10.09.2024].
- Cracowski, J.-L., Boutouyrie, P. (2016). Inhibitors of the renin-angiotensin system. *In Blood pressure measurement and cardiovascular prevention* (ss. 3-10). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75159-2.00001-4>, [10.09.2024].
- Cross, M. L., Gill, H. S. (2000). Immunomodulatory properties of milk. *The British Journal of Nutrition*, 84 Suppl 1, S81-89. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002294>, [10.09.2024].
- Çağlar, A. F. (2019). *Yağı alınmış fındık posalarının tripsin, kimotripsin ve termolisin enzimleri ile muamele edilmesi sonucu oluşan bazı biyoaktif peptitlerin belirlenmesi* [Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı]. <http://openaccess.izu.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12436/2230>, [10.09.2024].
- Çakır, B., Gülseren, I. (2019). Identification of novel proteins from black cumin seed meals based on 2D gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS analysis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(3), 384-390. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00751-9>, [10.09.2024].
- Deeth, H. C., Bansal, N. (2019). Chapter 1- Whey proteins: An overview. In H. C. Deeth & N. Bansal (Ed.), *Whey Proteins* (ss. 1-50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00001-1>, [10.09.2024].
- Devries, M. C., Phillips, S. M. (2015). Supplemental protein in support of muscle mass and health: Advantage whey. *Journal of Food Science*, 80(S1), A8-A15. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12802>, [10.09.2024].
- Dinç, A. (2018). *İmidazolinone herbisitlerine dayanıklı melez ayçiçeği populasyonlarında biyometrik- genetik analizler* [Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü]. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/689078>, [10.09.2024].

- Duan, F., Zhao, R., Yang, J., Xiao, M., Lu, L. (2021). Integrated utilization of dairy whey in probiotic  $\beta$ -galactosidase production and enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides. *Catalysts*, 11(6), 658. Article 6. <https://doi.org/10.3390/catal11060658>, [10.09.2024].
- Dullius, A., Goettert, M. I., de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>, [10.09.2024].
- Duncan, P. I., Aitio, O., Heiskanen, A., Niemelä, R., Saarinen, J., Helin, J., Porta, N., Fiaux, M., Moënnoz, D., Golliard, M., Cherbut, C., Berrocal, R., Austin, S., Sprenger, N. (2020). Structure and function of bovine whey derived oligosaccharides showing synbiotic epithelial barrier protective properties. *Nutrients*, 12(7), 2007. <https://doi.org/10.3390/nu12072007>, [10.09.2024].
- Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>, [10.09.2024].
- Enayati, M., Gong, Y., Goddard, J. M., Abbaspourrad, A. (2018). Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. *Food Chemistry*, 266, 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.051>, [10.09.2024].
- Eroğlu, E. Ç. (2016). *Fındık protein hidrolizatlarının antihipertansif etkisinin (ACE inhibisyon aktivitesinin) belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Esen, B. (2022). *Development of fermented vegan food formulations with improved angiotensin-1 converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity* [M.Sc.]. <https://www.proquest.com/docview/2812064798/abstract/9354F3C124024A8EPQ/1>, [10.09.2024].
- Ferreira, M., Cappato, L. P., Silva, R., Rocha, R., Guimarães, J., Fasura Balthazar, C., Esmerino, E., Freitas, M., Napole Rodrigues, F., Granato, D., Cucinelli, R., Tavares, M. I., Silva, P., Raices, R., Silva, M. (2019). Ohmic Heating for

- processing of whey-raspberry flavored beverage. *Food Chemistry*, 297, 125018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125018>, [10.09.2024].
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S-8S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S>, [10.09.2024].
- García, A., Martínez, P., López, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine milk and their physiological effects in humans: Generalities and molecular aspects. Center for Genomic Biotechnology of the National Polytechnic Institute. *ResearchGate*. 9-12.
- Garg, L., Kumar, K. (2021). Industrial applications of whey. *The Pharma Innovation*, 10, 387-390. <https://doi.org/10.22271/tpi.2021.v10.i2e.5695>, [10.09.2024].
- Gassmann, M. (2010). Protein fractionation by ultrafiltration and microfiltration. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (ss. 1–20). *John Wiley & Sons*.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>, [10.09.2024].
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C. ve Aluko, R. E. (2011). *In vitro* antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa L.*) protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 381–389.
- Giroto, F., Alibardi, L., Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008>, [10.09.2024].
- Gomez, G., Mendez, B., Nikel, P. I., Pettinari, M., Prieto, M., Silva, L. (2012). Making green polymers even greener: Towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products. *Advances in Applied Biotechnology*, (ss. 45-67). <https://doi.org/10.5772/31847>, [10.09.2024].

- Göksu, A. G., Çakır, B., Gülseren, İ. (2022). Industrial utilization of bioactive hazelnut peptide fractions in the manufacture of functional hazelnut paste: ACE-Inhibition and allergy suppression. *Waste and Biomass Valorization*, 13, 3561-3572. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01750-9>, [10.09.2024].
- Guimarães, J. T., Silva, E. K., Ranadheera, C. S., Moraes, J., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Ferreira, M. S., Freitas, M. Q., Meireles, M. A. A., Cruz, A. G. (2019). Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 55, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.025>, [10.09.2024].
- Guo, M., Wang, G. (2019). History of whey production and whey protein manufacturing. *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119256052.ch1>, [10.09.2024].
- Guzmán-Pérez, V., Bumke-Vogt, C., Schreiner, M., Mewis, I., Borchert, A., Pfeiffer, A. F. H. (2016). Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from *tropaeolum majus* reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells. *PloS One*, 11(9), e0162397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162397>, [10.09.2024].
- Gülseren, İ., Çakır, B. (2019). Preliminary investigations in vitro ACE-Inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *Gıda*, 44(2), 309-317. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18125>, [10.09.2024].
- Gültekin Subaşı, B., Vahapoğlu, B., Capanoglu, E., Mohammadifar, M. A. (2022). A review on protein extracts from sunflower cake: Techno-functional properties and promising modification methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(24), 6682-6697. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1904821>, [10.09.2024].
- Gürbüz, Z., Erkaya Kotan, T., Gürmeriç, H. E. ve Şengül, M. (2023). Piyasada satılan yoğurtların fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve ADE-inhibitör aktivitelerinin belirlenmesi. *Gıda*, 48(6), 1366-1378.
- Hammam, A., Tammam, Dr. A., El-Derwy, Y., Hassan, A. (2017). *Functional Peptides in Milk Whey: An Overview*. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 48, 77-91. <https://doi.org/10.21608/ajas.2017.19875>, [10.09.2024].

- Harnedy-Rothwell, P. A., McLaughlin, C. M., Crowe, W., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., Devaney, M., Whooley, J., McGovern, B., Parthasarathy, V., O'Harte, F. P. M., FitzGerald, R. J. (2021). Stability to thermal treatment of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of a boarfish (*Capros aper*) protein hydrolysate when incorporated into tomato-based products. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1), 158-165. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14615>, [10.09.2024].
- Heidebrecht, H.-J., Kulozik, U. (2019). Fractionation of casein micelles and minor proteins by microfiltration in diafiltration mode. Study of the transmission and yield of the immunoglobulins IgG, IgA and IgM. *International Dairy Journal*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.009>, [10.09.2024].
- Herrera-Ponce, A. L., Alarcón-Rojo, A. D., Salmeron, I., Rodríguez-Figueroa, J. C., Herrera-Ponce, A. L., Alarcón-Rojo, A. D., Salmeron, I., Rodríguez-Figueroa, J. C. (2019). Physiological effects of bioactive peptides derived from whey proteins on health: A review. *Revista Chilena de Nutricion*, 46(2), 205-214. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182019000200205>, [10.09.2024].
- Hildebrandt, C. (2000). Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activity in human serum and its inhibition by various inhibitors. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(4), 345–352.
- Innocente, N., Biasutti, M., Blecker, C. (2011). HPLC profile and dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. *International Dairy Journal*, 21, 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.004>, [10.09.2024].
- Izawa, N., Kudo, M., Nakamura, Y., Mizukoshi, H., Kitada, T., Sone, T. (2015). Production of aroma compounds from whey using *Wickerhamomyces pijperi*. *AMB Express*, 5, 23. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0108-5>, [10.09.2024].
- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 602-617. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096>, [10.09.2024].

- Jahandideh, F., Wu, J. (2020). Perspectives on the potential benefits of antihypertensive peptides towards metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms21062192>, [10.09.2024].
- Jakubowicz, D., Wainstein, J., Landau, Z., Ahren, B., Barnea, M., Bar-Dayana, Y., Froy, O. (2017). High-energy breakfast based on whey protein reduces body weight, postprandial glycemia and HbA1C in Type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 49, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.005>, [10.09.2024].
- Kamal, H., Jafar, S., Mudgil, P., Murali, C., Amin, A., Maqsood, S. (2018). Inhibitory properties of camel whey protein hydrolysates toward liver cancer cells, dipeptidyl peptidase-IV, and inflammation. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8711-8720. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14586>, [10.09.2024].
- Kaminarides, S., Zagari, H., Zoidou, E. (2020). Effect of whey fat content on the properties and yields of whey cheese and serum. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 71, 2149. <https://doi.org/10.12681/jhvms.23640>, [10.09.2024].
- Wirunsawanya, K., Jaruvongvanich, V., Upala, S. (2017). Full article: Whey protein supplementation improves body composition and cardiovascular risk factors in overweight and obese patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Nutrition*. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07315724.2017.1344591>, [10.09.2024].
- Karamoko, G., Renaville, R., Blecker, C. (2016). Interfacial activities of milk total proteose-peptone: Contribution and miscibility of nonhydrophobic and hydrophobic fractions. *International Dairy Journal*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.03.015>, [10.09.2024].
- Kareb, O., Aïder, M. (2019). Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: A critical Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 348-369. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9427-6>, [10.09.2024].
- Keppler, J., Koudelka, T., Palani, K., Tholey, A., Schwarz, K. (2014). Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with small hydrophobic ligands—influence of covalent atc

- modification on  $\beta$ -LG tryptic cleavage. *Food Biophysics*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9361-4>, [10.09.2024].
- Koçak, A., & Şanlı, T. (2016). Süt proteini kaynaklı ACE-inhibitör peptitleri: Oluşumu, etki mekanizması ve biyoyararlılıkları. *Gıda*, 41(4), 275–282.
- Koh, B. B., Lee, E. J., Ramachandraiah, K., Hong, G.-P. (2019). Characterization of bovine serum albumin hydrolysates prepared by subcritical water processing. *Food Chemistry*, 278, 203-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.069>, [10.09.2024].
- Kolesovs, S., Semjonovs, P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey-current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 7723-7730. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9>, [10.09.2024].
- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., Narodoslawsky, M. (2013). Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. *Resources, Conservation and Recycling*, 73, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.01.017>, [10.09.2024].
- Król, J., Brodziak, A., Zaborska, A., Litwińczuk, Z. (2017). Comparison of whey proteins and lipophilic vitamins between four cow breeds maintained in intensive production system. *Mljekarstvo*, 67, 17-24. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0102>, [10.09.2024].
- Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/foods8080347>, [10.09.2024].
- Layman, D. K., Lönnerdal, B., Fernstrom, J. D. (2018). Applications for  $\alpha$ -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 76(6), 444-460. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>, [10.09.2024].
- Lee, S. Y., Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506-517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>, [10.09.2024].

- León-López, A., Pérez-Marroquín, X. A., Estrada-Fernández, A. G., Campos-Lozada, G., Morales-Peñaloza, A., Campos-Montiel, R. G., Aguirre-Álvarez, G. (2022). Milk whey hydrolysates as high value-added natural polymers: functional properties and applications. *Polymers*, *14*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/polym14061258>, [10.09.2024].
- Li, X., Wang, D., Cai, D., Zhan, Y., Wang, Q., Chen, S. (2017). Identification and high-level production of pulcherrimin in bacillus licheniformis DW2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*(4), 1323-1335. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2500-x>, [10.09.2024].
- Li, X., Yuan, S., Huang, M., Gao, J., Wu, Z., Yang, A., Tong, P., Chen, H. (2016). Identification of IgE and IgG epitopes on native Bos d 4 allergen specific to allergic children. *Food & Function*, *7*(10), 4567-4578. <https://doi.org/10.1039/C6FO00416D>, [10.09.2024].
- Li, Y., Yu, J. (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of Medicinal Food*, *18*(2), 147-156. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0028>, [10.09.2024].
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(4), 2083-2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>, [10.09.2024].
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., Aparnathi, K. D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*(8), 134-155. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016>, [10.09.2024].
- Megías, C., Pedroche, J., Del Mar Yust, M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., Vioque, J. (2009). Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *64*(2), 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0108-1>, [10.09.2024].
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., Vioque, J. (2009). Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography

following affinity purification. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 228-232. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.003>, [10.09.2024].

Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, s. G., Jana, A., Buttar, H., Telessy, I., Awuchi, C., Okpala, C., Korzeniowska, M., Guiné, R. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: an insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. *Journal of Functional Foods*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760>, [10.09.2024].

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. ve Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.

Miralles, B., Amigo, L., Recio, I. (2018). Critical review and perspectives on food-derived antihypertensive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(36), 9384-9390. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02603>, [10.09.2024].

Modler, W. (2009). Pioneer paper: Value-added components derived from whey. *American Dairy Science Association*, 22-24.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>, [10.09.2024].

Nabuco, H. C. G., Tomeleri, C. M., Sugihara Junior, P., Fernandes, R. R., Cavalcante, E. F., Antunes, M., Ribeiro, A. S., Teixeira, D. C., Silva, A. M., Sardinha, L. B., Cyrino, E. S. (2018). Effects of whey protein supplementation pre- or post-resistance training on muscle mass, muscular strength, and functional capacity in pre-conditioned older women: a randomized clinical trial. *Nutrients*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/nu10050563>, [10.09.2024].

- Nasri, M. (2017). Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A Review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 81, 109-159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>, [10.09.2024].
- Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Wang, Y., Ip, D. T. M., Wan, D. C. C., Xia, J. (2015). Antiviral activities of whey proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 6997-7008. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6818-4>, [10.09.2024].
- Nielsen, C. L. (2018). *Investigations of polyhydroxyalkanoate secretion and production using sustainable carbon sources* [M.S.]. <https://www.proquest.com/docview/2043000282/abstract/2941CF57C10A4FFEPQ/1>, [10.09.2024].
- O’Riordan, N., O’Callaghan, J., Buttò, L. F., Kilcoyne, M., Joshi, L., Hickey, R. M. (2018). Bovine glycomacropptide promotes the growth of *Bifidobacterium longum* ssp. *Infantis* and modulates its gene expression. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6730-6741. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14499>, [10.09.2024].
- Ostertag, F., Eva, F. (2023). Protein valorisation from acid whey – Screening of various micro- and ultrafiltration membranes concerning the filtration performance. *International Dairy Journal*, 146, 105745. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105745>, [10.09.2024].
- Özkaya, P., Dağbağlı, S., Uyarcan, M. (2024). Utilization of food waste in production of bacterial cellulose. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 60(4), 737-749. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1350359>, [10.09.2024].
- Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., Sindhu, N. (2018). Whey valorization: Current options and future scenario – A critical review. *Nutrition & Food Science*, 48(4), 522-535. <https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017>, [10.09.2024].
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General*

- Subjects*, 1426(3), 439-448. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00165-2), [10.09.2024].
- Permyakov, E., Berliner, L. (2000). Alpha-Lactalbumin: Structure and function. *FEBS letters*, 473, 269-274.
- Pescuma, M., de Valdez, G. F., Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183-6196. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6766-z>, [10.09.2024].
- Petrovič vd. (2024). Hydrothermal conversion of oilseed cakes into valuable products: Influence of operating conditions and whey as an alternative process liquid on product properties and their utilization. *Energy Conversion and Management*, 313, 118640. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.118640>, [10.09.2024].
- Pomés, A. (2010). Relevant B cell epitopes in allergic disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(1), 1-11. <https://doi.org/10.1159/000260078>, [10.09.2024].
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712-4718. <https://doi.org/10.1021/jf904456r>, [10.09.2024].
- Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Malcata, F. X. (2016). Whey and whey powders: Production and uses. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* (ss. 498-505). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9>, [10.09.2024].
- Rout, P., Chakraborty C., Hüseyin, Ş. (2024). Functional characterization of enzyme-hydrolysed soy and whey protein isolates: A comparative approach. *Food Chemistry Advances*, 5, 100745. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100745>, [10.09.2024].
- Rutherford, S. M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515-1522.

- Schlatterer, B., Baeker, R., Schlatterer, K. (2004). Improved purification of beta-lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 807(2), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.013>, [10.09.2024].
- Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constantino, C. A., Castañeda-Ovando, A., Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010-1027. <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>, [10.09.2024].
- Sharma, R. (2019). Chapter 17—Whey Proteins in Functional Foods. H. C. Deeth N. Bansal (Ed.), *Whey Proteins* (ss. 637-663). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00018-7>, [10.09.2024].
- Shenana, M. (2021). Physico-chemical and functional properties of functional yoghurt made with different types of whey protein concentrates (Wpc). *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59, 455-462. <https://doi.org/10.21608/assjm.2021.195014>, [10.09.2024].
- Shokri, S., Ehsani, A. (2017). Efficacy of whey protein coating incorporated with lactoperoxidase and  $\alpha$ -tocopherol in shelf life extension of Pike-Perch fillets during refrigeration. *LWT- Food Science and Technology*, 85, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.026>, [10.09.2024].
- Silva, E., Oliveira, J., Silva, Y., Urbano, S., Sales, D., Moraes, E., Rangel, A., Anaya, K. (2020). Lactoperoxidase system in the dairy industry: Challenges and opportunities. *Czech Journal of Food Sciences*, 38, 0-00. <https://doi.org/10.17221/103/2020-CJFS>, [10.09.2024].
- Silva, M., Silvestre, M., Silva, V., Souza, M., Junior, C., de Oliveira, W., Lana, F., Rodrigues, D. (2014). Production of ACE-inhibitory whey protein concentrate hydrolysates: Use of pancreatin and papain. *International Journal of Food Properties*, 17. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.685821>, [10.09.2024].

- Singh, S., Khemariya, P., Rai, A. (2014). Process optimization for the manufacture of lemon based beverage from hydrolyzed whey. *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 691-699. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0563-1>, [10.09.2024].
- Sitohy, M., Taha, S., Osman, A., Abdel-Hamid, M., Hamed, A., Abdelbacki, A. (2020). Antiviral action of native and methylated lactoferrin and  $\beta$ -lactoglobulin against potato virus Y (PVY) infected into potato plants grown in an open field. *Antibiotics*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070430>, [10.09.2024].
- Skalickova, S., Heger, Z., Krejcová, L., Pekarík, V., Bastl, K., Janda, J., Kostolansky, F., Vareckova, E., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R. (2015). Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses*, 7(10), 5428-5442. <https://doi.org/10.3390/v7102883>, [10.09.2024].
- Skrzypczak, K., Fornal, E., Waśko, A., Gustaw, W. (2019). Effects of probiotic fermentation of selected milk and whey protein preparations on bioactive and technological properties. *Italian Journal of Food Science*, 31(3). <https://doi.org/10.14674/IJFS-1438>, [10.09.2024].
- Smith, G. I., Commean, P. K., Reeds, D. N., Klein, S., Mittendorfer, B. (2018). Effect of protein supplementation during diet-induced weight loss on muscle mass and strength: A randomized controlled study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 26(5), 854-861. <https://doi.org/10.1002/oby.22169>, [10.09.2024].
- Smithers, G. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>, [10.09.2024].
- Spöttel, J., Brockelt, J., Badekow, S., Rohn, S. (2021). Immunological analysis of isothiocyanate-modified  $\alpha$ -Lactalbumin using high-performance thin layer chromatography. *Molecules*, 26(7), 1842. <https://doi.org/10.3390/molecules26071842>, [10.09.2024].
- Staroń, J., Dąbrowski, J. M., Cichoń, E., Guzik, M. (2018). Lactose esters: Synthesis and biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 245-258. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1332571>, [10.09.2024].

- Taş, N. ve Güneşer, O. (2021). Fermentasyon ve enzimatik hidroliz uygulanan peynir altı suyunun bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(2), 279–290.
- Teixeira, F. J., Santos, H. O., Howell, S. L., Pimentel, G. D. (2019). Whey protein in cancer therapy: A narrative review. *Pharmacological Research*, 144, 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.019>, [10.09.2024].
- Tessier, R., Khodorova, N., Calvez, J., Kapel, R., Quinsac, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Gaudichon, C. (2020). 15N and 2H intrinsic labeling demonstrate that real digestibility in rats of proteins and amino acids from sunflower protein isolate is almost as high as that of goat whey. *The Journal of Nutrition*, 150(3), 450-457. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>, [10.09.2024].
- Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438-454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>, [10.09.2024].
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., Yavuz, M. (2014). Biocontrol activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens. *Biotechnology Research International*, 2014, 397167. <https://doi.org/10.1155/2014/397167>, [10.09.2024].
- Umayaparvathi, S., Selvaraju, M., Vinayagam, V., Muthuvel, A., Gunasekaran, S., Thangavel, B. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.04.006>, [10.09.2024].
- Smith, J., Ark., T. (2020). Effect of plant-based protein hydrolysates on %ACE inhibition during storage in functional food products. *Food Chemistry*, 264, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.051>
- Urtasun, N., Baieli, M., Hirsch, D., Martinez Ceron, M., Wolman, F. (2017). Lactoperoxidase purification from whey by using dye affinity chromatography. *Food and Bioproducts Processing*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.02.011>, [10.09.2024].

- Valdez Castillo, M., Laxman Pachapur, V., Brar, S. K., Naghdi, M., Arriaga, S., Ávalos Ramirez, A. (2020). Yeast-driven whey biorefining to produce value-added aroma, flavor, and antioxidant compounds: Technologies, challenges, and alternatives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 930-950. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1792407>, [10.09.2024].
- Villanueva, A., Clemente, A., Bautista Palomas, J. D., Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites*, 50. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i6.697>, [10.09.2024].
- Vivas, Y., Morales, A., Otálvaro, Á. (2016). Aprovechamiento de lactosuero para el desarrollo de una bebida refrescante con antioxidantes naturales utilization of whey in the development of a refreshing beverage with natural antioxidants. *Alimentos Hoy*, 24, 185.
- Wang, B., Timilsena, Y., Blanch, E., Adhikari, B. (2016). Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.087>, [10.09.2024].
- Wang, Q., Chen, G. Q., Kentish, S. E. (2020). Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electro dialysis with filtration membrane process. *Separation and Purification Technology*, 233, 115987. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115987>, [10.09.2024].
- Wang, Z., Zhang, X. (2017). Isolation and identification of anti-proliferative peptides from *Spirulina platensis* using three-step hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 918-922. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7815>, [10.09.2024].
- Wijayanti, H., Bansal, N., Deeth, H. (2014). Stability of whey proteins during thermal processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105>, [10.09.2024].
- Willison, L. N., Zhang, Q., Su, M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., Roux, K. H. (2013). Conformational epitope mapping of Pru du 6, a major allergen

from almond nut. *Molecular Immunology*, 55(3-4), 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.02.004>, [10.09.2024].

Wu, J., Aluko, R. E. ve Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732–738.

Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 1), 756-774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>, [10.09.2024].

Zhang, X., Zhao, Y. ve Wang, H. (2020). Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Alcalase and Flavourzyme: Effects on physicochemical, functional, and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2020-2028.

# ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Merve GENÇ

**Pozisyon:** Gıda Mühendisi

## A. EĞİTİM

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

Yüksek Lisans | Gıda Mühendisliği [2024 🎓]

Lisans | Gıda Mühendisliği, Türkçe [2020 🎓]

KAZIM KARABEKİR ANADOLU İMAM HATİP LİSESİ: [2016 🎓]

ARNAVUTKÖY MERKEZ İLKÖĞRETİM OKULU: [2011 🎓]

## B. PROFESYONEL DENEYİM

Do&Co Catering Services | İstanbul

Stajyer (4 Ay) | Haziran 2019- Eylül 2019

- Gıda güvenliği ve kalite yönetim süreçlerinin uygulanması ve denetimi.
- Catering üretim hatlarında ürün kalitesinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar.
- Hammaddeden nihai ürüne kadar geçen sürecin kontrolü.

## C. PROJELER

Kenevirin Fonksiyonel Gıdalarda Kullanımı | [2021/2022]

- Proje İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ BAP PROJESİ kapsamında gerçekleştirilmiştir.
- Kenevirin fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi ve gıda uygulamalarında kullanım olanaklarının araştırılması.

Gıda Üretim, Depolama ve Sindirim Süreçlerinin Biyoaktif Peptit Kararlılığına Etkisi ve Bu Etkinin Model Gıda Ürünlerinde İncelenmesi | [2023/2024]

- Proje TÜBİTAK 1001 BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI tarafından desteklenmiştir.
- Depolama ve sindirim süreçlerinde biyoaktif peptitlerin kararlılığını artırmaya yönelik yöntemlerin geliştirilmesi.

Model gıda ürünlerinde biyoaktif bileşenlerin etkilerinin incelenmesi.

#### **D. SERTİFİKA VE EĞİTİMLER**

TS EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

TS EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

TS 18001:2014 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

TS EN ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

Temel Gıda Hijyen Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

Fikri ve Sınai Mülkiyet Hakları Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2019]

Helal ve Haram Gıdalar Eğitimi | Avicenna Sağlık Platformu [2016]

#### **E. DİĞER EĞİTİMLER**

- İngilizce | B2 (Devam Ediyor)

#### **F. TEKNİK YETKİNLİKLER**

- Gıda analiz teknikleri

- Gıda güvenliği ve kalite kontrol süreçleri
- Proje yönetimi ve raporlama
- Microsoft Office
- SPSS
- Minitab

