

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

SOĞUK PRESLENMİŞ ÇÖREK OTU POSALARINDAN
PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÜRETİLMESİ VE
HİDROLİZATLARIN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İnci ZENT

İstanbul
Kasım, 2019

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SOĞUK PRESLENMİŞ ÇÖREK OTU POSALARINDAN
PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÜRETİLMESİ VE
HİDROLİZATLARIN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İnci ZENT

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim GÜLSEREN

İstanbul
Kasım, 2019

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamdaki her aşamada bana yol göstererek destek olan ve çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında katkılarını esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim GÜLSEREN'e teşekkür ve saygılarımı sunarım

Lisans ve yüksek lisans eğitim süreçlerimde bilgi ve birikimleri ile yardımlarını esirgemeyen İZÜ Laboratuvarlar Koordinatör Yardımcısı Bilal ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Tuğçe KÖK'e ve Ayşe Gülden GÖKSU'ya teşekkür ederim.

Ayrıca soğuk preslenmiş çörek otu posalarının temini konusunda Oneva firmasına ve TÜBİTAK 1001 projesiyle (Proje No: 2170063, "Türk fıncığı posasının fonksiyonel gıdalarda kullanımının incelenmesi") tez çalışmalarına kısmi olarak maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım dahil tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

İnci ZENT
İstanbul - 2019

ÖZET

SOĞUK PRESLENMİŞ ÇÖREK OTU POSALARINDAN PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÜRETİLMESİ VE HİDROLİZATLARIN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnci Zent

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Gülseren

Kasım-2019, 119 Sayfa

Çörek otu (*Nigella sativa* L.), birçok kültürde geleneksel halk tıbbında özellikle yağının ve içindeki çözünür bileşenlerin biyoaktif özelliklerinden dolayı kullanıldığı bir tohumdur. Bu çalışmanın amacı, gıda sanayi yan ürünü olan soğuk preslenmiş çörek otu (*Nigella sativa*) posalarından protein konsantresi üretilmesi ve bu konsantrelerin papain ve tripsin enzimleri ile farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) muamelesi sonucu elde edilen hidrolizatların antioksidatif ve diğer biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla çörek otu protein konsantrelerine ve hidrolizatlarına antioksidatif testlerden DPPH, demir şelasyon ve hidroksil radikali tutma aktivitesi testleri; bir diğer biyoaktivite testi olan asetilkolinestraz (AChE) inhibisyon (anti-Alzheimer aktivite belirleme) testi uygulanmıştır.

DPPH tutma aktivitesi testinde en yüksek aktivite % 59.80 ± 2.6 oranı ile 120 dakikalık papain hidrolizatına aitken; demir şelasyon testinde en yüksek aktivite % 59.23 ± 5.5 ile 90 dakikalık papain hidrolizatına; hidroksil radikali tutma aktivitesi testinde en yüksek aktivite sırası ile hidroliz edilmemiş protein konsantresine (% 61.12 ± 1.5) ve % 60.51 ± 2 oranı ile 15 dakikalık papain hidrolizatına ait olduğu bulunmuştur. Antioksidatif testlerin sonuçları, en yüksek antioksidatif aktivite % 61.12 ± 1.5 oranı ile hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinin hidroksil radikali tutma aktivitesine aittir. Yapılan analizler sonucu daha kısa sürede optimum sonuçlar veren hidrolizatların (30 dakikalık muamele sonucu üretilen papain ve tripsin hidrolizatları) uygun tekniklerle fraksiyonlanmasına karar verilmiştir. Fraksiyonlama işlemleri

sonucu elde edilen dört adet fraksiyona (PA, PB, PC ve PD) LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler uygulanmıştır. Bu analizler sonucunda biyoaktif olma ihtimali, PA fraksiyonunda (PeptideRanker değeri) > % 50 olan bir peptit (ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLK) ve PB fraksiyonunda (PeptideRanker değeri) > % 50 olan 2 peptit (PICESLNILEYIDEIWPHNR ve YDLDFK) bulunmuştur. PB fraksiyonunda bulunan ve 6 amino asitten oluşan YDLDFK peptidi, en yüksek PeptideRanker değerine sahip olduğu asetilkolinesteraz enzimi (AChE) ile etkileşimi şematize edilmiştir. YDLDFK peptidi anti-Alzheimer testinde kullanılan AChE üzerinde 12 muhtemel bağlanma noktasına sahip olduğu için inhibisyona neden olabilmektedir. Tüm bu analizler sonucunda; çörek otu protein konsantresi veya hidrolizatlarının gıda endüstrisinde ürün kalitesinin korunması amacıyla doğal ve bitkisel kaynaklı antioksidatif ajan olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bununla beraber, toksik olmadığı bulgulanmış olan çörek otu protein konsantresi ve hidrolizatlarının kısmen AChE inhibitör aktivitesine sahip olduğu bulgulanmıştır. Biyoaktif peptit içerme potansiyeline sahip olduğu öngörülen çörek otu proteinlerinden bu bileşenleri içeren katma değerli ürünler geliştirilebileceği öngörülmektedir. Çörek otunun doğrudan tüketiminin zor olması nedeniyle biyoaktif peptitler yoluyla gıdaların zenginleştirilmesinin bitkinin tüketim miktarları ile biyoaktif potansiyelini de iyileştirme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu, papain, tripsin, biyoaktif peptit, fraksiyon, antioksidatif, hidrolizat.

ABSTRACT

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYZATES FROM COLD PRESS DEOILED BLACK CUMIN MEALS AND EVALUATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF HYDROLYZATES

İnci Zent

Master of Science, Food Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İbrahim Gülseren

November-2019, 119 Pages

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is a seed that has been utilized in traditional folk medicine in many cultures and especially due to the bioactive characteristics of black cumin oil and therein solubilized components. The aim of this study was to evaluate the antioxidative and bioactive properties of hydrolyzates obtained from cold press deoiled black cumin seed (*Nigella sativa*) meals, a food industry waste, by product and the treatment of the meals with papain and trypsin enzymes for varying treatment durations (15, 30, 60, 90 and 120 minutes). Based on this purpose, black cumin seed protein concentrates and their hydrolyzates were subjected to DPPH, iron chelation and hydroxyl radicals retention scavenging tests for the investigation of potential antioxidative characteristics and an anti-Alzheimer activity test based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE).

The highest activity in the DPPH tests corresponded to papain hydrolysate of 120 minutes at an inhibition rate of $59.80 \% \pm 2.6$; while the highest activity in iron chelation test accounted for $59.23 \% \pm 5.5$ for the 90 minute treated papain hydrolyzate sample and the highest activity in the hydroxyl radical scavenging test was observed for the papain hydrolyzate prepared at 15 min with an inhibition rate of $60.51 \% \pm 2$ while the results for the unhydrolyzed protein concentrate ($61.12 \% \pm 1.5$) were comparable. To evaluate the results of antioxidative tests, the highest antioxidative activity belongs to the hydroxyl radicals scavenging activity of unhydrolyzed black cumin seed protein concentrate with $61.12 \% \pm 1.5$. Consequently, 30 min treated hydrolyzates (i.e., 30 minute papain and trypsin hydrolysates) yielded optimum results and were fractionated based on appropriate techniques. In addition, LC-Q--TOF/MS

analysis and *in silico* analysis were applied to four fractions (PA, PB, PC and PD) obtained by fractionation. As a result of these analyzes, 1 peptide (ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLK) in the PA fraction was found to be bioactive (i.e., PeptideRanker value > 50 %), and 2 peptides (PICESLNILEYIDEIWPHNR and YDLDFK) in the PB fraction yielded similar results. The YDLDFK peptide consisting of 6 amino acids in the PB fraction has the highest PeptideRanker value and its interaction with AChE was schematized. The YDLDFK peptide might have the potential to inhibit AChE and has 12 potential binding sites on this enzyme. Consequently; we anticipate that black cumin protein concentrates or hydrolysates can be used as antioxidative agent of natural and plant origin in order to maintain product quality in food industry. Furthermore, black cumin seed protein concentrates and hydrolyzates were shown to be non-toxic and have been found to demonstrate partially AChE inhibitory activity. It is anticipated that value-added products containing these components can be developed from black cumin seed proteins that are considered to have the potential to contain bioactive peptides. Since the direct consumption of black cumin seed is rather difficult, the enrichment of foods with bioactive peptides enhances the consumption and bioactivity potential of black cumin seeds.

Keywords: Black cumin, papain, trypsin, bioactive peptide, fraction, antioxidative, hydrolyzate.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ	1
BİRİNCİ BÖLÜM.....	4
LİTERATÜR TARAMASI	4
1.1. Bitkisel Kaynaklı Gıda Atıkları ve Yan Ürünlerinin Değerlendirilmesi	4
1.2. Çörek Otunun Bileşimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ...	6
1.3. Soğuk Pres Yöntemi ile Yağ Eldesi	8
1.4. Proteinler	9
1.4.1. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri ve Gıdalarda Kullanımı	12
1.5. Bitkisel Proteinlerin Genel Özellikleri	15
1.5.1. Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyonu.....	19
1.5.2. Yağlı Tohum Proteinleri	20
1.5.3. Çörek Otu Proteinleri	21
1.6. Biyoaktif Peptitler	22
1.6.1. Proteolitik Hidroliz ve Enzim Dışı Yöntemler.....	27
1.6.2. Papain ve Tripsin Enzimlerinin Kullanımı	29
1.7. Peptitlerin Fraksiyonlanması	33
İKİNCİ BÖLÜM	36
MATERYAL VE METOT	36
2.1. Materyal.....	36
2.2. Örnek Hazırlama	36

2.2.1.	Soğuk Preslenmiş Çörek Otu Posalarından Protein Ekstraksiyonu	36
2.2.2.	Kjeldahl Metodu ile Protein Miktarı Tayini.....	39
2.2.3.	Çörek Otu Protein Ekstraktlarının Proteolitik Hidrolizi	39
2.3.	Biyoaktivite Testleri	41
2.3.1.	Asetilkolinesteraz (AChE) Önleyici Aktivitesi Testi.....	41
2.3.2.	Antioksidatif Aktivite Testleri	41
2.3.2.1.	DPPH Tutma Aktivitesi Testi	41
2.3.2.2.	Demir Şelasyon Aktivite Testi.....	42
2.3.2.3.	Hidroksil Radikali Tutma Aktivitesi Testi.....	42
2.4.	Peptitlerin Fraksiyonlanması	42
2.4.1.	Fraksiyonlanmış Peptitlerin DPPH Tutma Aktivitesi Testi.....	43
2.4.2.	Fraksiyonlanmış Peptitlerin LC-MS/MS Analizi.....	43
2.4.3.	Fraksiyonlanmış Peptitlerin <i>In Silico</i> Analizleri	44
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM		45
BULGULAR VE TARTIŞMA.....		45
3.1.	Biyoaktivite Testleri	46
3.1.1.	AChE Önleyici Aktivite Testi.....	46
3.1.2.	Antioksidatif Aktivite Testleri	48
3.1.2.1.	DPPH Tutma Aktivitesi Testi.....	49
3.1.2.2.	Demir Şelasyon Aktivite Testi.....	51
3.1.2.3.	Hidroksil Radikali Tutma Aktivitesi Testi.....	53
3.2.	Peptitlerin Fraksiyonlanması	55
3.2.1.	Fraksiyonlanmış Peptitlerin DPPH Analizi	56
3.3.	LC MS/MS Analizi	58
3.4.	<i>In Silico</i> Analizler.....	62
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM		69
SONUÇLAR VE ÖNERİLER		69
KAYNAKÇA		72
ÖZGEÇMİŞ.....		94

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1:** Soğuk preslenmiş çörek otu posaları..... 37
- Şekil 2.2:** Blender yardımıyla küçük parçalar haline getirilen yağı alınmış çörek otu posaları 37
- Şekil 2.3:** Yağı alınmış çörek otu posası ve su dispersiyonu (1:15 ağı/hacim).....38
- Şekil 2.4:** Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen çörek otu protein konsantreleri 38
- Şekil 2.5:** Fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik çörek otu protein konsantresi dispersiyonu 39
- Şekil 2.6:** Enzimatik hidrolize hazır çörek otu protein süpernatantları 40
- Şekil 2.7:** Papain ve tripsin enzimleri ile farklı sürelerde (0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilerek elde edilmiş çörek otu protein konsantresi ve hidrolizatları 40
- Şekil 2.8:** Çörek otu protein konsantresi ve hidrolizatlarının santrifüj ve filtrasyon işlemi sonrası görüntüleri..... 41
- Şekil 3.1:** Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri AChE önleyici aktiviteleri. 47
- Şekil 3.2:** Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri DPPH inhibisyonu..... 50
- Şekil 3.3:** Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri demir şelasyon aktiviteleri. 52
- Şekil 3.4:** Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri hidroksil radikali tutma aktiviteleri..... 54

- Şekil 3.5:** Papain ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein ekstraktlarının HiTrap 1 ml Cpto DEAE (zayıf anyonik) kolon ve 35 CV ile fraksiyonlanma ve elde edilen 4 (PA, PB, PC ve PD) fraksiyonun kromatogramı..... 56
- Şekil 3.6:** Çörek otu protein konsantresinin (P), papain enzimi ile 30 dakikalık hidrolizi sonrası fraksiyonlanmış protein hidrolizatların (PA, PB, PC ve PD) ve bu hidrolizat konsantrasyonlarının hacmen iki katına çıkarılmış (2PA, 2PB, 2PC VE 2PD) örneklerinin DPPH inhibisyon aktiviteleri (standart sapma < % 5)..... 57
- Şekil 3.7:** PA fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NELLFAEIEYMQK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir..... 59
- Şekil 3.8:** PB fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum IDWKETPEAHVFK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir..... 60
- Şekil 3.9:** PC fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ALIEQIK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir. 61
- Şekil 3.10:** PB fraksiyonu peptitleri arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır. 67

TABLULAR LİSTESİ

- Tablo 3.1:** Farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dak.) papain ve tripsin enzimleri ile elde edilen hidrolizatlardan, antioksidatif testler ve Asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon testinde elde edilen en yüksek sonuçlar. 45
- Tablo 3.2:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi..... 63
- Tablo 3.3:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi..... 63
- Tablo 3.4:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi..... 64
- Tablo 3.5:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi..... 64
- Tablo 3.6:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi..... 65
- Tablo 3.7:** LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi..... 66
- Tablo 3.8:** YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır..... 68

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
mM	Milimolar
ml	Mililitre
μ M	Mikrometre
nm	Nanometre
vb.	ve Benzeri
FeCl ₂	Demir Klorür
CA	Selüloz Asetat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DTNB	5,5-Dithiobis-(2-Nitrobenzik Asit)
ATCI	Asetilkolin İyodid
AChE	Asetilkolinesteraz
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
FPLC	Performanslı Sıvı Kromatografi
LC-Q-TOF/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

GİRİŞ

Biyoaktif peptitler; vücut fonksiyonları ve koşulları üzerinde olumlu etkilere sahip olan ve sağlığı olumlu yönde etkileyebilen protein parçalarıdır (Kitts ve Weiler, 2003). İnsan sağlığı açısından önemli rol oynayan biyoaktif peptitler işlevsel özelliklerine göre; antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, opioid, immünomodülatör, mineral bağlayıcı ve antioksidan olarak sınıflandırılmaktadır (Sharma, Singh ve Rana, 2011). Gıda endüstrisinde kullanılan ham maddeler yeni ürünlere dönüştürülürken endüstriyel yan ürünler ve büyük miktarlarda çeşitli atıklar açığa çıkmaktadır (Keklikçi ve Selçuk, 2018). Çevre kirliliğine neden olan bu atıklar, biyolojik olarak kolayca parçalanamayan ve işlenmesi zor olan yan ürünlerdir. Bununla beraber söz konusu atıklar proteinler ve biyoaktif peptitler gibi değerli bileşenler de içerebilmektedir. Yakın geçmişte yapılan bir çalışmada; zeytinyağı üretme prosesi sonucu açığa çıkan atık posadan elde edilen proteinlerin, antioksidatif ve antihipertansif peptitler içerdiği belirlenmiştir (Esteve, Marina ve Garcia, 2015). Küresel olarak var olan 300.000 bitki türünün sadece % 15'inin farmakolojik potansiyelinin araştırıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle doğal kaynaklardan yeni ürünlerin geliştirilmesi de teşvik edilen bir konudur (Yimer vd., 2019).

Şifalı bitkiler arasında olan çörek otu (*Nigella sativa* L.), dünya tarihindeki en değerli besin içeriğine sahip olan bitki olarak kabul edilmiştir (Yimer vd., 2019). Çörek otu (*Nigella sativa* L.), Ranunculaceae (düğün çiçeğigiller) familyasında yer alan ve başta Doğu Akdeniz ülkeleri olmak üzere ülkemiz de dahil birçok ülkede yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan bir bitkidir (Kılıç ve Arabacı, 2016; Salem, 2005). Ülkemizde çörek otu yetiştiriciliği İstanbul, Bursa, Konya, Afyon, Samsun, Nevşehir, Amasya, Mersin, Gaziantep, Kahramanmaraş, Kütahya, Burdur, Isparta illerinde ve çevresinde yapılmaktadır (Koşar ve Özel, 2018). Türkiye'de çörek otunun 2016 verilerine göre; ekim alanı 4.681 da ve üretimi 425 ton iken 2015 yılı ithalatı 2898 ton olarak gerçekleşmiştir (Bulca, 2014). 2000 seneden daha uzun bir süredir Ortadoğu ve Uzakdoğu ülkelerinde doğal bir ilaç olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir (Özçelik ve Bayram, 2012). *Nigella* cinsinin 14'ünün ülkemiz florasında bulunduğu belirtilmekle beraber toplam 20 türe sahip bu bitki; yaklaşık 20-30 cm yüksekliğe erişebilen, tek yıllık, otsu ve yaz aylarında mavi, yeşil renkli çiçekler açan, güzel kokan bir bitkidir (Salem, 2005). *Nigella sativa*, birçok hastalıkta şifa kaynağı olduğu için Ortadoğu

ülkelerinde “Habbat Al Barakah” yani “Kutsanmış Tohum” olarak da bilinmektedir (Gün, 2012). Çörek otunun (*Nigella sativa* L.), yiyecekleri korumak, lezzeti arttırmak amacıyla kullanıldığı ve tıpta kullanılan bitkiler arasında olduğu bilinmektedir (Kılıç ve Arabacı, 2016).

Çörek otunun kimyasal bileşimi hasat mevsimine, çeşidine, yetiştirildiği iklime ve bölgeye göre çeşitlilik gösterebilmektedir (Bulca, 2014). Bununla beraber besin değeri yüksek olan çörek otunun kimyasal bileşimini; uçucu yağlar (% 0.4-0.45), doymuş/doymamış sabit yağlar (% 32-40), karbonhidratlar (% 33.9), proteinler (% 16.0-19.9), mineraller (% 1.79-0.45), vitaminler (askorbik asit, tiyamin, niasin, pridoksin ve folik asit), alkaloidler, tanenler ve saponinler oluşturmaktadır (Şeflek, 2015). Çörek otu tohumu dokuz esansiyel amino asitten sekizini içermektedir (Omar vd., 1999). Glikoz, rhamnoz, ksiloz ve arabinoz formunda monosakkaritler bulundurmakta ve doymamış yağ asidi profilini linoleik asit ve oleik asit oluşturmaktadır (Mahmoud, El-Abhar ve Saleh, 2002). Tohumlar, karaciğer tarafından A vitaminine dönüştürülen karoten de içermektedir. Ayrıca tohumlar, kalsiyum, demir ve potasyum yönünden zengin bir kaynaktır (Al-Jassir, 1992).

Bitkilerin ilaç olarak kullanılması, insanlığın ilk yıllarına kadar dayanmaktadır. Şifalı bitkilere ve alternatif tedaviye yönelik ilgi; modern tıp uygulamalarının yan etkileri konusunda duyulan endişe nedeniyle, doğal ürünlere yönelmenin ve bitkisel ilaçların etkinliklerinin araştırılmasıyla artmıştır (Fong, 2002). Bitkisel tedavide kullanılan bitkilerin ve izole bileşenlerinin büyük bir kısmı; antioksidan, anti-enflamatuar, anti-kanser, antimikrobiyal ve immünomodülatör etkiler dahil olmak üzere birçok faydalı terapötik etki göstermiştir (Parab, Kulkarni ve Thatte, 2003).

Nigella sativa, tarihi ve dini olarak ümit vadecici zengin bir geçmişe sahiptir (Goraja, 2003). Çörek otu tohumları uzun yıllardır Orta ve Uzak Doğu’da halk hekimliğinde; bronşiyal astım, baş ağrısı, dizanteri, enfeksiyonlar, obezite, sırt ağrısı, hipertansiyon ve gastrointestinal problemlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Schleicher ve Salem, 2005). Ayrıca bir cilt hastalığı olan egzamanın tedavisinde kullanımı da dünya çapında kabul görmüştür (Goreja, 2003). *Nigella sativa*’nın; anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antitümör ve immünomodülatör vb. özellikleri ile bu özelliklerinin terapötik potansiyelleri olduğu belirtilmektedir (Salem, 2005).

Çörek otu yağı son yıllarda özellikle sağlık ve gıda teknolojisi alanlarında sıkça kullanılan maddelerden biri haline gelmiştir (Bulca, 2014). Yağı alınan çörek otunun yan ürünü olan posası çevre kirliliğine yol açmasının önlenmesi ve katma değer oluşturulması amacıyla hayvan beslenmesinde yem kaynağı olarak kullanılmaktadır. *Nigella sativa* tohumlarına birçok farmasötik ve biyolojik özellikler atfedilmiş olması, çörek otunun yağı dışında da değerli bileşenlere sahip olduğunu göstermektedir (Yimer vd., 2019). Bu nedenle endüstriyel proseslerde soğuk preslenmiş dolayısıyla proteinlerinin minimum zarar gördüğü düşünülen çörek otu posasının; çevreyi korumak, katma değerli ürün geliştirmek, faydalı bileşenlerin insan sağlığının korunmasında kullanmak gibi amaçlarla araştırılmasını cazip hale getirmektedir.

Çalışmamız soğuk preslenmiş çörek otu posasından protein ekstraktlarının elde edilmesini, elde edilen proteinlerin enzimatik hidrolizini, hidrolize örneklerin (peptitlerin) modern tekniklerle fraksiyonlanmasını, bu hidrolizatların ve fraksiyonlanmış örneklerin antioksidatif ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesini içermektedir. Bu kapsamda, protein ekstraksiyonu ve hidroliz sonucu elde ettiğimiz örneklere; DPPH, demir şelasyon aktivitesi, hidroksil radikali tutma anti-oksidatif aktivite testleri ve anti-Alzheimer biyoaktivite testi uygulanmıştır. Fraksiyonlama sonucu elde ettiğimiz örneklere ise DPPH tutma aktivitesi testi, LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler uygulanmıştır.

BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

1.1. Bitkisel Kaynaklı Gıda Atıkları ve Yan Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Gıda işleme prosesleri sonucunda, büyük bir kısmı çevre kirliliğine neden olan ya da ekonomik değeri az olan hayvan yemi ve gübre gibi ürünlere dönüştürülen büyük miktarlarda atıklar oluşmaktadır (Yağcı vd., 2006).

Dünya genelinde her yıl insan tüketimi için üretilen gıdaların üçte biri atık olarak harcanmaktadır (Pleissner ve Kin, 2013). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından 2013 yılında yapılan araştırmaya göre atılan gıda miktarı 1.3 milyon ton olarak belirlenmiştir (Topkaya, 2017). Bu miktarın içerisine tahıllar, kökler, yağlı tohumlar, bakliyatlar, meyve ve sebzeler, et, deniz ürünleri, süt ve yumurta dahil olmak üzere tüm gıdalar dahildir (Pleissner ve Kin, 2013). Avrupa’da toplam gıda atıklarının yüzde dağılımı; % 42 evsel atık, %39 gıda üretim ve işleme sanayi, % 14 catering sektörü ve % 5 toptan ve perakende sektörü kaynaklıdır. Avrupa’da kişi başına düşen yıllık gıda atık miktarının ise 280-300 kg’a ulaştığı belirtilmektedir (FAO, 2013). TÜİK 2011 verilerine göre Türkiye’nin toplam atık miktarının 25.8 milyon ton olarak olduğu ve % 49.5 oranla atık üretimi açısından gıda sanayinin ilk sıradaki sektör olduğu belirtilmektedir (Topkaya, 2017).

Dünya nüfusunun giderek artmasıyla birlikte gıda atık miktarının da artacağı öngörülerek insan sağlığı, çevre kirliliği ve ekonomi açısından atıkların doğru bir şekilde değerlendirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Bu nedenle açığa çıkan bu atıkların değerlendirilmesi hem ekonomik açıdan hem de çevre kirliliğinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Gıda atıklarının değerlendirilmesi konusunda yapılacak çalışmalar, çevre kirliliğinin önlenmesine, gıdaların zenginleştirilmesine, değerli bileşenlerin insan metabolizmasına girmesine, katma değer oluşturularak ekonomiye katkı sağlanmasına ve gıda sanayinin gelişmesine katkı sunacağından önem arz etmektedir (Yağcı vd., 2006).

Avrupa Birliği’nin izlediği atık yönetimi yaklaşımı yalnızca atıkları yönetmekten çıkmış olup kaynakların geri kazanımını da içermektedir. Avrupa Birliği, “daha azla daha fazla yapmak” anlayışını benimseyerek atıkları önemli bir kaynak olarak görmektedir ve atıkların geri dönüşümü ve geri kazanımında çeşitli uygulamalara

sahiptir (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Çevre politikası AB’de 1970’lerden itibaren oluşmaya başlamıştır ve çeşitli ilkeler doğrultusunda belirlenen çevre politikası ile çevre eylem programları oluşturularak ve bu programlar çerçevesinde hareket edilerek bilinçli bir çevre politikası belirlenmiştir (Çokgezen 2007). Son dönemdeki en önemli gelişmelerden biri ise 2 Aralık 2015 tarihinde atık yönetimi ile ilgili kapsamlı bir eylem planını içeren Döngüsel Ekonomi Paketinin Avrupa Komisyonu tarafından kabul edilmesi olmuştur (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Döngüsel Ekonomi (Circular Economy) yeni bir üretim sistematiğidir ve Avrupa Komisyonu bu sistematiikle Avrupa’nın sürdürülebilir ekonomik büyümeyi hızlandırmasını ve küresel rekabetteki yerini sağlamlaştırmasını beklemektedir (EC, 2015). Komisyonun bu paketi açıklaması aynı zamanda 2030 Sürdürülebilir Kalkınma Gündemindeki hedefleri uygulamaya yönelik de bir adımdır (EC, 2015). Döngüsel ekonomi AB için daha akıllı, kapsayıcı büyüme öngören ve sürdürülebilir bir Avrupa 2020 Stratejisi için kaynak verimliliği sağlayacak bir sistemdir (Veral ve Yiğitbaşıoğlu, 2018). Avrupa Birliği’nin çevre politikasının ilkeleri; bütüncülük ilkesi, yüksek seviyede koruma ilkesi, ihtiyat ilkesi, önleme ilkesi, kaynakta önleme ilkesi ve kirleten öder ilkesi olarak sıralanabilir (Çokgezen, 2007). Bütüncülük ilkesi diğer politikalar ile çevre korumasının entegrasyonunu; yüksek seviyede koruma ilkesi topluluğun tüm kurumlarının (Avrupa Komisyonu, Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Konseyi) çevre politikalarını dikkate alarak karar almalarını; ihtiyat ilkesi alınacak kararların çevreye etkisinin test edilmeden önlem alınmasını; önleme ilkesi zarara uğramadan önce önlem alınmasını; kaynakta önleme etkisi; çevreye olacak zararın kaynağında önlenmesini; kirleten öder ilkesi ise; temel taş bir ilke olup kirletenlere neden oldukları kirlilik ve mücadelenin bedelinin ödetilmesini içermektedir (Çokgezen, 2007).

AB’de 1992’ye kadar çevre ile ilgili FEOGA (Avrupa Tarımsal Yönlendirme ve Garanti Fonu), FSE (Avrupa Sosyal Fonu) ve FEDER (Avrupa Bölgesel Kalkınma Fonu) fonlarının kullanıldığı görülmektedir. Daha sonra bu fonlara uyumlaştırma fonu (Maastrich Anlaşması) da eklenmiştir (Çokgezen, 2007).

Gıda atıklarının besin değerinin oldukça zengin olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Özellikle protein içeriği yüksek bitkisel kaynaklı gıda atıklarının değerlendirilmesine yönelik çalışmalara son yıllarda ağırlık verilmektedir (Görgüç, 2018). Bu atıklardan bazıları pirinç kepeği, yulaf kepeği, ayçiçeği küspesi, yulaf küspesi ve buğday kepeğidir (Gao, Smith ve Tsompo, 2014; Hanmoungjai, Pyle

ve Niranjana, 2001). Yapılan çalışmalarda meyve ve sebzelerin kabuk, çekirdek ve sap gibi atık kısımlarının değerli biyoaktif bileşenler içerdiği ve besin değerlerinin yüksek olduğu belirtilmektedir (Tuna, 2015). Örneğin portakal kabuğundaki fenolik bileşenlerin kabuksuz portakala göre % 15 daha fazla; elma, şeftali ve armut meyvelerinin kabuklarındaki fenolik bileşenlerin meyve kısmına göre 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Gorinstein vd., 2002).

Çevre kirliliği ve artan popülasyonun gıda kaynaklarını sınırlandırması, atıklar ve yan ürünlerin değerlendirilmesi sonucu elde edilecek ekonomik kazançlar, endüstriyel gıda atıklarının değerlendirilmesini bir gereklilik haline getirmektedir (Tuna, 2015). Yağ ekstraksiyonu sonrası yağlı tohum posalarında proteinler oldukça konsantre olur ve protein içeriklerinin % 60'a kadar çıkabileceği ucuz yan ürünlerden protein ürünleri üretilebilir. Ekonomik nedenlere ek olarak, yağlı tohum posalarından protein ürünlerinin üretimi atık azaltma gibi çevresel sorun çözümüne de katkı sağlayacaktır (Coşkun vd., 2019).

Bu tez çalışması, gıda sanayi yan ürünlerinden olan çörek otunun soğuk preslenmesi ile yağ eldesi sonucu açığa çıkan posayı değerlendirmek amacıyla protein ve peptitlerinin biyoaktivite özelliklerini araştırmayı amaçlamaktadır.

1.2. Çörek Otunun Bileşimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çörek otu, Ranunculaceae familyasının *Nigella sativa* türüne ait olan tek yıllık otsu bir bitkidir (Gharby vd., 2015). Çörek otu tohumları ağırlıkça yaklaşık olarak % 21 protein, % 35 karbonhidrat ve % 35-38 oranında yağdan oluşmaktadır (Baydar, 2009). Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve güneybatı Asya'ya özgü olmakla beraber Hindistan, Pakistan, Suriye, Türkiye ve Suudi Arabistan gibi dünyanın pek çok ülkesinde yetiştirilmektedir (Ahmad vd., 2013). Emtia Ticaret İstatistikleri Veritabanına göre çörek otunun küresel tüketiminin 187.000 ton olduğu tahmin edilmektedir (Coşkun vd., 2019). Çörek otunun küresel üretiminin % 85'inden fazlasını Hindistan gerçekleştirirken, % 3.5'i Suriye ve % 2.8'i Türkiye tarafından üretilmektedir (Anonim, 2014).

N.sativa dünya çapında yaygın olarak kullanılan şifalı bir bitki olmakla beraber Unani ve Tibb, Ayurveda ve Siddha gibi çeşitli geleneksel tıp sistemlerinde de oldukça popülerdir. *N.sativa*'nın tohum ve yağı üzerine çeşitli ilaç ve gıda sistemlerinde geleneksel halk tıbbında uzun bir geçmişi bulunmaktadır (Ahmad vd., 2013). Çörek

otu en az 2000 yıldır geleneksel ve doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Çakır ve Gülseren, 2019). Dolayısıyla sağlık alanında en zengin geçmişe sahip olan bitkilerden olduğunu söylemek mümkündür (Ermumcu ve Şanlıer, 2017). İslam literatüründe ise şifa tıbbının en önemli formlarından biri olarak kabul edilmektedir (Ahmad, 2013). Tıp tarihinin en ünlü kitap yazarlarından olan İbn-i Sina, çörek otunun metabolizmayı uyarak vücut enerjisini düzenlediğini ve halsizliği önlediğini belirtmiştir (Ayhan, 2012).

Siyah tohum ve kara kimyon olarak da bilinen çörek otu Orta Doğu ülkeleri ve dünyanın diğer birçok ülkesinde astım, bronşit, diyare, baş ağrısı, romatizma, hipertansiyon, ateş ve grip rahatsızlığın tedavisinde bitkisel bir tıbbi ilaç olarak kullanılmıştır (Silahtaroglu vd., 2014). Daha önce yapılan çalışmalarla çörek otu tohum ekstrelerinin *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal aktivite etkide bulunarak büyümelerini engellediği gösterilmiştir (Hanafy ve Hatem, 1991).

Çörek otunun sağlığa yararları üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda antifungal, antimikrobiyal, antistosozomyas, antioksidan, antidiyabetik, antikanser, antienflamatuar ve analjezik, immünmodülatör, kardiyovasküler, gastro koruyucu, hepato koruyucu, nefroprotektif, akciğer koruyucu ve antiastım, antikonvülsan, antioksitoksik aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Padhye vd., 2008). Çörek otu aynı zamanda gıda endüstrisinde oksidasyonu önleyici bitkisel bir antioksidan ajan olarak ve çeşitli gıdalarda baharat olarak kullanılmaktadır (Hassanien vd., 2015). Değerli bileşenleri bünyesinde bulunduran çörek otunun, bu değerli bileşenleri insan metabolizmasına katmak amacıyla kullanım alanları genişletilmelidir. Kullanım alanlarının kısıtlı olmasından dolayı artırmaya yönelik yapılacak araştırmalara ve çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bahsi geçen biyoaktif özelliklerin çoğu durumda timokinon ve uçucu yağlar gibi tohum bileşenlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Hadi, Mohammed ve Hameed, 2016). *N.sativa* bitkisi üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla tohum ekstreleri ve yağıyla ilgili olduğundan çalışmalar iki ayrı bölümde ele alınabilir (Ayhan, 2012). Tohum ekstrelerinde fenolik bileşenler, steroidler, proteinler ve alkaloidler tespit edilip çalışmalarda bunlar üzerine yoğunlaşmışken; çörek otu yağından steroller izole edilerek çalışılmıştır. Timokinon (TQ) bileşiği ise fenolik bileşen içeriğinin büyük bir

kısmını oluşturmakta ve biyolojik aktivitelerde önemli bir yeri bulunmaktadır (Al-Yahya, 1986).

N.sativa'nın tohum ve bileşenlerinin terapötik etkilerinin ve etki mekanizmalarının incelenmesi için yapılacak çalışmalar önem arz etmektedir (Ahmad vd., 2013). TQ ve alfa-hederin bileşikleri bilinmekle beraber araştırmalar sonucu belirlenecek diğer biyoaktif bileşenleri de çeşitli hastalıkların tedavisinde ve kemoterapötik ajanlarla uygun kombinasyonlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilme potansiyeli vardır (Ahmad vd., 2013).

Çörek otunun fonksiyonel özelliklerini ilgilendiren çalışmaların çoğu genellikle çörek otunun yağı üzerine olduğundan dolayı çörek otu tohumlarının protein bileşenlerine ait biyoaktif özellikleri çok daha az araştırılmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019). Dolayısıyla *N.sativa* bitkisinin proteinleri ile ilgili yapılacak çalışmalar sayesinde daha fazla bilgi edinilmesi ile bu bitki kaynağının bitkisel, fonksiyonel ya da terapötik etkilerinden düzenli bir diyet ile bilinçli bir şekilde faydalanılması sağlanabilir. Tohumun tüketimi nispeten zor olduğundan protein bileşenlerinin üretimi ile bitkinin yenilebilirlik özellikleri geliştirilebilir (Çakır ve Gülseren, 2019).

Çörek otu tohumunun protein miktarı göz önüne alınarak yağı alınmış tohum posalarında protein içeriğinin % 30'dan daha fazla olması beklenebilir (Coşkun vd., 2019). Bitkisel kaynaklı protein bazında yağlı tohumlar tahıllara göre oldukça yüksek miktarda protein içermektedir (Potter ve Hotchkiss, 1995). Proteinlerin hem teknik hem de biyolojik anlamda işlevsel biyomoleküller oldukları ve çörek otu tohumunu tüketmenin zorluğu düşünüldüğünde bu değerli kaynaktan protein ürünleri üreterek küresel üretimin ve tüketimin artırabileceği öngörülmektedir (Coşkun vd., 2019). Bu çalışmada üretilebilecek olan fonksiyonel bileşenlerle bu potansiyelin destekleneceği düşünülmektedir.

1.3. Soğuk Pres Yöntemi ile Yağ Eldesi

Yağlı tohumlardan yağ elde etme yöntemleri arasında çözücü ekstraksiyonu, mekanik yöntemler, enzim destekli ekstraksiyon, yüksek basınç ekstraksiyonu, distilasyon, hidrolik pres gibi birçok farklı metot kullanılmaktadır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Mekanik yöntemler genellikle yağ içeriği % 20'nin altında olan yağlı tohumlardan yağ çıkarmak için kullanılır ve katı-sıvı faz ayırma sistemi olarak

tanımlanabilir (Zuorro vd., 2014). Söz konusu fazın ayrılmasında ise basınç kullanılır ve sıcaklık uygulanıp uygulanmamasına bağlı olarak da sıcak veya soğuk presleme olarak adlandırılır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018).

Çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyon yöntemleri toksik, pahalı ve çevre açısından oldukça zararlıdır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Bu nedenle yüksek kalitede ham yağ elde etme isteği ve ekolojik nedenler mekanik yöntemlerin kullanım nedenlerindedir (Richter vd., 1996). Ayrıca presleme yöntemi ile yağ eldesi prosesinin bir yan ürünü olarak protein bakımından zengin pres keki elde edilmektedir (Singh ve Bagale, 2000). Presleme yönteminde, çözücü ekstraksiyonu yöntemi kadar yüksek verimle yağ elde edilememesi bu yöntemin dezavantajıdır (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Ham maddenin soyulması, kurutulması, çözücü ile ya da enzimatik olarak işlenmesi gibi ön işlemler ve besleme hızı ve sıcaklık gibi işlem parametreleri yağ verimi açısından büyük rol oynamaktadır (Savoire, Lanoiselle ve Vorobiev, 2013).

Soğuk presleme yönteminde ürüne ısı işlem uygulanmadığından yüksek kalitede yağlar elde edilmektedir (Çakaloğlu, Özyurt ve Ötleş, 2018). Bitkisel yağların insan metabolizmasındaki ana fonksiyonlarına ek olarak içerdikleri biyoaktif bileşenleriyle insan sağlığına olan olumlu katkılarından dolayı soğuk pres yoluyla üretilen bitkisel yağlara tüketici ilgisi gittikçe artmaktadır (Matthous ve Brühl, 2003).

Özetlemek gerekirse soğuk pres yağ üretim teknikleri; basit, ekolojik, düşük maliyetli, zararlı organik çözücü gerektirmeyen ve yüksek kalitede ürün eldesi sağlayan bir yöntemdir (Gürpınar, Geçgel ve Taşan, 2011). Ancak ham maddeden elde edilen yağ verimi düşüktür ve ürün standardını yakalamak zordur (İmer ve Taşan, 2018).

1.4. Proteinler

Latince “canlı organizmalar için temel unsur” anlamına gelen proteinler, canlı bir hücrenin yaklaşık olarak % 50’sini oluşturan makromoleküllerdir (Batır, 2018). Proteinler karbon, hidrojen ve azottan oluşan organik monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşur ve bazı proteinler ek olarak bakır, demir, fosfor ya da çinko gibi metal iyonları da içermektedir (Batır, 2018). Proteinler; α -karbon atomuna bir hidrojen atomunun, bir amino grubunun (-NH₂), bir karboksil grubunun (-COOH) ve bir yan zincir R grubunun kovalent bağ ile bağlanmasıyla oluşan yirmi farklı amino asit tarafından oluşturulan oldukça kompleks polimerlerdir (Özdal, Çapanoğlu ve Altay,

2013). Amino asitler peptit bağlarıyla birbirlerine bağlanır ve peptit bağları kovalent bağlardır (Batır, 2018).

Proteinler arasındaki yapı ve fonksiyon farklılıkları, amino asitlerin birbirlerine farklı diziler ile bağlanmalarından kaynaklanmaktadır (Eryılmaz, 2016). R grupları amino asidin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini ve içinde bulunduğu proteinin spesifikasyonlarını belirler (Batır, 2018).

Proteinler kimyasal bileşimlerine göre basit ve konjuge proteinler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Basit proteinler sadece amino asitlerden oluşurken; konjuge proteinler amino asit yanında organik ya da inorganik gruplara da sahiptir. Globulinler ve albüminler basit proteinlere; fosfoproteinler, lipoproteinler ve nükleoproteinler konjuge proteinler sınıfına dâhildir (Owusu-Apenten, 2004).

Proteinler şekillerine göre ise globüler ve fibröz olarak sınıflandırılmaktadır. Globüler proteinler, polipeptitlerin küresel bir şekilde katlanmasıyla proteinin küre şeklini alması sonucu oluşur (Göğüş ve Fadıloğlu, 2006). Globüler proteinler suda ya da tuzlu suda çözünürken; ısıya, aside ve alkaliye karşı hassastır. Ayrıca spesifik katalitik etkiye sahip olduklarından enzimlerin de yapı taşlarını oluştururlar. Kazein, hemoglobin, ovalbümin ve miyogloblin globüler proteinlere örnektir (Owusu-Apenten, 2004). Fibröz proteinler; her biri sıkıca bağlanmış, suda çözünmeyen, alkali ve aside duyarlılığı bulunmayan fakat ısıya karşı hassas olan birleşik aminoasitlerdir. Tendon, kas, cilt ve hücre organelleri gibi vücut yapılarının oluşmasında rol alırlar. Gluten, elastin ve kollojen fibröz proteinlere örnek olarak gösterilebilir (Owusu-Apenten, 2004).

Protein molekülü içerisinde hem pozitif hem negatif yüklere sahip olan amino asitler bulunduğu için protein amfoterik molekül gibi davranır ve hem asidik hem de bazik özellik gösterir (Batır, 2018). Moleküllerin toplam yüklerinin sıfır olduğu durum, izoelektrik pH değeri olarak adlandırılır. Yükleri eşit olan iyonlar nötrdür ve elektrik alanında hareket edemezler. Proteinler izoelektrik noktada minimum çözünürlük göstererek çok kolay bir şekilde çöktülebilirler (Batır, 2018).

Her protein kendine özgü üç boyutlu bir şekle sahiptir ve proteinin biyolojik aktivitesi üç boyutlu şeklini değiştirmektedir. Proteinin yapısı dört aşamalı (birincil, ikincil, tersiyer ve kuaterner) olarak gerçekleşebilmektedir ve benzer primer yapıya sahip proteinler benzer şekil ve fonksiyonlara sahiptir (Lin, Wu ve Wang, 2012). Protein

denatürasyonunda ikincil, tersiyer ve kuaterner yapılar bozulur ama birincil yapı ile amino asit düzeni aynı kalmaktadır. Denatürasyonda peptit bağları bozulmadan fiziksel ya da biyolojik açıdan değişim olmaktadır ve denatürasyon işlemi disülfid bağları tahrip edilmemişse sıklıkla geri dönüştürülebilir (Lin, Wu ve Wang, 2012).

Proteinler hem teknik hem de biyolojik açısından işlevsel biyomoleküllerdir (Coşkun vd., 2019). Aktif bileşenler olarak proteinlerin fizyolojik rolü gittikçe daha fazla kabul görmekte ve beslenme yolu ile alınmaları önem taşımaktadır. Gıda maddelerinde doğal olarak bulunan proteinlerin çoğu *in vitro* veya *in vivo* olarak doğrudan enzimatik hidroliz üzerine fizyolojik etki gösterirler (Korhonen ve Pihlanto, 2006).

Proteinlerin temel görevi karbonhidratlar ve yağlar gibi enerji sağlamak, aynı zamanda vücut için gerekli bazı enzimlerin oluşumuna katkıda bulunmaktır (Demirci, 2011). İnsan vücudu azotlu bileşiklere ihtiyaç duyar ve proteinler yapısında azot bulundurduğu için temel bileşenlerdendir (Batır, 2018). Yetersiz beslenme sonucu enerji sağlamak için proteinlerin ayrışmasına ihtiyaç duyulması durumunda Marasmus ve Kuvaşiorokor hastalıkları ortaya çıkmaktadır (Demirci, 2011).

Proteinler çoğunlukla süt, et (balık ve kümes hayvanları dâhil), yumurta, tahıllar, baklagiller ve yağlı tohumlarda bulunan önemli besin bileşenleridir (Özdal, Çapanoğlu ve Altay, 2013). Hayvansal kaynaklı proteinler (et, balık, kümes hayvanları ve yumurtalar) bitkisel proteinlere göre daha yaygındır (Owusu-Apenten, 2004). Bitkisel ve hayvansal proteinler dışında ek olarak algler, mayalar ve bakteriler (tek hücre proteinleri) de protein kaynağı olarak değerlendirilebilir (Tahergorabi ve Hosseini, 2017).

Proteinler besin değerlerine ek olarak, gıdalara eklendiklerinde faydalı özellikler gösteren fonksiyonel gıda bileşenleri olarak büyük bir potansiyel sunmaktadır (Oreopoulou ve Tzia, 2006). Dolayısıyla Proteinler hem beslenme hem de gıda teknolojisi ve işleme aşamaları için gereklidir (Batır, 2018). Gıda formülasyonlarında fonksiyonel görevler üstlenmek amacıyla proteinler yoğun olarak kullanılmaktadır (Panyam ve Kilara, 1996). Aşağıda proteinlerin fonksiyonel özellikleri ve kullanımları detaylı olarak incelenecektir.

1.4.1. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri ve Gıdalarda Kullanımı

Proteinler büyüme, gelişme ve sağlıklı yaşam için gerekli olan besin öğelerindendir (Çetiner ve Bilek, 2018). Birçok gıda proteini çok iyi işlevsel özelliklere sahip olduğu için gıda bileşeni olarak gıdanın değerini arttırmaktadır. Gıda formülasyonlarında fonksiyonel etkiler sağlanması amacıyla proteinlerin kullanımı ise giderek artmaktadır (Panyam ve Kilara, 1996). Proteinlerin sahip olduğu fonksiyonel özellikler amino asit bileşimi ve dizisi gibi iç faktörlerle beraber pH, sıcaklık ve iyonik ortam gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir (Boye vd., 2010; Panyam ve Kilara, 1996). Ayrıca proteinin yapısı, şekli ve yüzey hidrofobikliği, ekstraksiyon ve protein ürünlerinin üretiminde uygulanan kurutma işlemleri fonksiyonel özellikleri belirleyen çeşitli faktörlerdir (Boye vd., 2010).

Gıda proteinlerinin fonksiyonel özellikleri gıda ürünlerinin üretimi, depolanması ve tüketimi sırasında protein davranışını etkileyen fiziksel ve kimyasal özellikler olarak ifade edilmektedir (Boye vd., 2010). Gıda teknolojisinde proteinler; gıdaların işlenmesi, hazırlanması, depolanması ve tüketilmesi aşamalarında gıdanın kalitesini ve duyu özelliklerini muhafaza etmeleri açısından önemli bir yere sahiptir (Durmuş ve Evranuz, 2005). Proteinler sahip oldukları fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikleriyle fonksiyonel etkiler göstererek gıdalara istenen özelliklerin kazandırılmasını sağlar (Özcan ve Delikanlı, 2011). Bir gıda sisteminde protein kullanımı gerekli görüldüğünde, gıdanın özellikleri dikkate alınarak kullanılacak olan protein bileşenlerinin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiş olmaktadır (Durmuş ve Evranuz, 2005).

Proteinlerin fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri arasında boyut, şekil, yük dağılımı, amino asit kompozisyonu ve dizilimi, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, diğer moleküllerle olan etkileşim yeteneği, hidrofobisite/hidrofilite oranı ve esneklik/sertlik durumu yer almaktadır (Hanmoungjai, Pyle ve Niranjan, 2002). Amino asitlerin bileşimi, sıralanışı ile sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini ortaya çıkarmaktadır (Gençcelep, 2008). Proteinlerin sahip olduğu ve gıda sistemlerinde göstermeleri beklenen etkiler arasında çözünürlük, su emme, su bağlama, emülsifiye etme, yağ emme, köpürme, jelleşme, krem oluşturma, viskozite sağlama, yapışma, elastikiyet, plastisite, renk ve aroma bağlama, kataliz etme gibi birçok fonksiyonel özellik sıralanabilir (Sathe, 2012; Boye vd., 2010). Bu özellikleri ile proteinler yapıyı ve ürünlerin organoleptik özelliklerini

oluşturur (Boye vd., 2010). Bazı gıdaların üretimi için çeşitli proteinlerin ayırt edici fonksiyonel özellikleri oldukça önemlidir. Örneğin; buğday gluteni, hamur elastikiyetini ve plastisitesini sağladığı için gluten hamur açısından oldukça önemli bir proteindir (Eryılmaz, 2016). Proteinlerin sahip olduğu fonksiyonel özellikler içerdiği protein türüne ve gıda sistemine bağlıdır ve yumurta proteinlerinde görülen köpürme özelliği gibi istenen ya da meyve ve sebzelerde enzimatik kahverengileşmeye neden olma gibi istenmeyen özellikler de olabilir (Sathe, 2012).

Çözünürlük, incelenen proteinin fonksiyonel performansını anlamak açısından önemli bir faktördür. Bunun sebebi, proteinin yetersiz çözünürlük performansının diğer fonksiyonel özellikleri de sınırlayabilmesidir (Eryılmaz, 2016). Su tutma kapasitesi, içerisinde su bulunan bir proteinin santrifüj kuvveti, yer çekimi kuvveti ya da sıkıştırmaya maruz kaldığında suyu tutma kabiliyetidir (Alfredo vd., 2009). Su tutma özelliği proteinin sahip olduğu H bağlarıyla suyu gıda matrisi içerisinde tutmasıyla gerçekleşir (Gençcelep, 2008). Çözünme özelliği ise su tutma kapasitesi ile ilgilidir. Su tutma kapasitesi arttıkça çözünme de artar. Emülsifiye etme kapasitesi proteinin, birbiri içinde çözünme ya da karışmaya kabiliyeti olmayan iki sıvının birbiri içinde dağılmasını kolaylaştıran bir madde olarak işlev görebilme yeteneğidir (Lopez-Vargas vd., 2013). Yağ tutma kapasitesi, proteinlerin yağ ile etkileşime girme kabiliyetini gösterir. Gıda formülasyonlarının oluşturulmasında ve işlenmesinde yağ emilimi ve lezzet tutma gibi birçok önemli özellik proteinler ile lipitlerin etkileşiminden ileri gelmektedir (Yust vd., 2010). Köpük oluşturma kabiliyeti gıda proteinlerinin sahip özellikler arasındadır. Köpükler, sıvı ya da sulu faz ile dağılmış gaz faza sahip olan proteinlerin oluşturduğu çift fazlı kolloidal sistemlerdir. Buna örnek olarak köpürme gerektiren tariflerde yumurta akının kullanılması gösterilebilir (Yust vd., 2010). Dolayısıyla proteinler işlenmiş gıda ürünlerinin temel fonksiyonel bileşenleridir ve gıda ürünlerinin dokusal, duyusal ve besinsel özelliklerini belirlemektedir (Zayas, 1977). Örneğin; buz yüzeyine bağlanabilme yetenekleri ile buz kristallerinin büyümesini ve kristalleşmesini kontrol etme yeteneğine sahip proteinler bulunmaktadır. Antifriz proteinler olarak adlandırılan bu proteinler, özellikle donmuş gıdalarda yeniden kristallenmenin önlenmesiyle yapısal ve mekanik hasarları engelleyerek kullanıldığı gıdanın duyusal özelliklerini geliştirmektedir (Yangılar ve Yıldız, 2016). Et proteinleri yüzey gerilimini düşürerek yağ ve su ara yüzeyine adsorbe olmaktadır. Proteindeki polar grupların suya, apolar grupların ise yağa yönelmesiyle

üç boyutlu yapılanmalar engellenmektedir. Bu nedenle et proteinleri çok iyi birer emülgatördürler (Gençcelep, 2008).

Gıda sistemlerinde kullanılan proteinlerinin temel görevlerini özetlemek gerekirse peynir altı suyu proteini çözünürlük ve viskozite özellikleriyle içeceklerde, çorbalarda, et sularında ve salata soslarında; kas ve yumurta proteini su bağlama, emülsiyon ve jel oluşturma özellikleriyle unlu ürünlerde, jellerde, sosislerde ve çorbalarda; yumurta ve süt proteini köpük oluşturma, yağ ve aroma bağlama özellikleriyle dondurmalarda, donutlarda, et ürünlerinde ve unlu ürünlerde kullanılmaktadır (Damodaran, 1994).

Gıdalarda kullanılmak üzere yeni protein kaynaklarının araştırılıp geliştirilmesinde fonksiyonel özellikler temel kriter olmaktadır. Bununla beraber duyuşal özelliklerinin kabul edilebilir düzeyde olması da aranan bir diğer özelliktir (Durmuş ve Evranuz, 2005). Bitkisel kaynaklı proteinler, gıda sistemlerinde beklenen fonksiyonel etkileri sıklıkla gösteremediğinden dolayı kullanımları kısıtlı olsa da enzimatik, kimyasal ve fiziksel modifikasyonlarla bu proteinlerin fonksiyonel özellikleri geliştirilebilmektedir (Chavan, Mckenzie ve Shahidi, 2001).

Yeni protein kaynağı olarak bitkisel proteinlere hem fonksiyonel besin bileşenleri hem de besin takviyeleri olarak kullanılmak üzere artan bir ilgi vardır (Khalid, Babiker ve El Tinay, 2003). Bitkisel proteinler insan tüketimine uygun ve sürdürülebilir bir protein kaynağıdır (Gülseren, 2018). Bitkisel proteinlerin hayvansal proteinlere dönüşme oranı yaklaşık olarak %15 olarak bilinmektedir (Day, 2013). Bu durum, özellikle protein için küresel talebin sürekli artması göz önüne alındığında gıda sistemleri ve diğer tüketici ürünlerinde bitkisel protein kullanımının önemini göstermektedir (Gülseren, 2018). Aynı zamanda bitkisel proteinler hayvansal proteinlere göre daha bol ve ucuz olmasına rağmen gıda sistemlerinde kullanımı ve tüketimi hala oldukça sınırlıdır (Day, 2013).

Günümüzde çoğu bitki proteini süt, et ve yumurta gibi kaynaklardan fonksiyonel hayvan proteinleri üretmek amacıyla hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Day, 2013). Bitkisel proteinler insan beslenmesinde özellikle ortalama protein alımının temel miktardan daha az olduğu gelişmekte olan ülkelerde önemli rol oynamaktadır (Eryılmaz, 2016). Bitkisel kaynaklı gıda atıklarının protein kaynağı olarak kullanılabilmesi için hem yüksek protein içeriğine hem de dengeli bir esansiyel amino asit içeriğine sahip olması gerekmektedir (Oreopoulou ve Tzia, 2006). Bir materyali

gıda ürünlerinde kullanabilmek için ek bir gereklilik de alerjik ve toksik maddelerin bulunmaması ya da etkin bir şekilde uzaklaştırılması için uygun bir ön işlem uygulanmasıdır (Oreopoulou ve Tzia, 2006). Günümüzde daha ucuz ve istenen düzeyde fonksiyonel özellikler gösteren protein unu, konsantresi veya izolatu eldesi ile ilgili çeşitli çalışmalar sürdürülmektedir (Durmuş ve Evranuz, 2005).

1.5. Bitkisel Proteinlerin Genel Özellikleri

Proteinler sahip oldukları çeşitli fonksiyonel özellikler ile gıda formülasyonlarında çokça yer alırlar (Kanu vd., 2007). Proteinlerin fonksiyonel özellikleri gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmalarını sağlayan; gıdaların depolanması, işlenmesi ve tüketilmesi esnasında gıdanın performansını yöneten fizikokimyasal özelliklerdir (Lamsal, Jung ve Johnson, 2007). Su tutma ve köpük bağlama, yağların emülsiyonu, aroma tutma, çözünürlük ve jelleşme özellikleri bu fonksiyonel özelliklerdendir (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Yüksek protein içeriği, fonksiyonel etkinlik, anti-beslenme faktörü düşüklüğü (fitik asit vb.) içeriklerinden dolayı protein ekstraktlarının gıda sanayinde kullanılması giderek artmaktadır (Singharaj ve Onsaard, 2015). Protein özütleri şekerleme, kozmetik atıştırılmalık, et ürünleri, gazsız içecekler gibi birçok üründe aroma artırıcı ve gıdayı zenginleştirici bileşen olarak kullanılmaktadır (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002).

Gıda üretiminde kullanılmak için yetiştirilen ham maddelerin esansiyel mineral ve vitaminleri günümüzde daha düşük oranda içerdiği ve bu durumun gittikçe artan dünya nüfusunu beslemek düşüncesiyle yürütülen hatalı tarım uygulamaları dolayısıyla ortaya çıktığı belirtilmektedir (Sikiric vd., 2003). Protein bakımından yetersiz beslenme önemli sağlık sorunlarını beraberinde getirmektedir (Ghaly ve Alkoaik, 2010). Beslenme eksikliğinde vücuttaki proteinin enerji için kullanılması durumunda vücut daha sonra diğer besin öğelerini (karbonhidrat, yağ) enerji kaynağı olarak temin edebilse de kaybedilen proteinin vücuda tekrar kazandırılması söz konusu olmamaktadır (Pimentel vd., 1975). Özellikle çocuklarda protein eksikliği, büyüme bozukluklarına ve hastalıklarda artışa sebep olmaktadır (Pimentel vd., 1975). Bununla beraber tüm dünyada 500 milyondan fazla insanın protein bakımından yetersiz beslendiği belirtilmektedir (Dando, 2012).

Sekiz esansiyel amino asidi daha yüksek oranda içermeleri ve biyoyararlılıklarının daha fazla olması bitkisel proteinlere göre hayvansal proteinlerin besleyici

özelliklerinin daha yüksek olmasını sağlamaktadır (Pimentel vd., 1975). Örneğin; mısır, buğday ve pirinç düşük miktarlarda lizin içermektedir (Pimentel vd., 1975). Genel olarak bitkisel proteinlerin lizin ve metiyonin esansiyel amino asitlerini düşük miktarda içerdiklerini söylemek mümkündür (Pimentel vd., 1975). Bitkisel proteinlerin, referans protein kaynağı (tavuk yumurtası) ile karşılaştırıldığında, bu kaynağın esansiyel amino asitleri % 62-81 oranında içerdiği belirtilmektedir (Krajcovicova-Kudlackova, Babinska ve Valachovicova 2005). Bununla beraber; hayvansal gıdalara nazaran daha az araştırılan bitkisel gıdalar da protein ürünleri içermektedir (Garcia vd., 2013). Bitkisel proteinlerin esansiyel amino asitler bakımından zengin olarak üretilmesi ekonomik açıdan oldukça önem taşımaktadır (Young ve Pellett, 1994). Protein hidrolizatlarından elde edilen kısa zincirli peptitlerin vücut tarafından etkin bir şekilde değerlendirildiği ve besleyici özelliklerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Gao, Smith ve Tsompo, 2014).

Küresel olarak ekonomik problemlerin artması, dini ve etik sınırlamalar, vejetaryenlik ve veganlık eğilimlerinin artması, sağlık endişeleri dolayısıyla hayvansal protein kullanmayan tüketici gruplarını kapsaması, besleyici içeriğe sahip olması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması gibi nedenler son zamanlarda gıda endüstrisinde hayvansal proteinlere alternatif olarak bitkisel proteinlerin kullanılmasını gündeme getirmektedir (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Proteinlerin sağlıklı yaşam için gerekliliğiyle beraber dünya nüfusunun artışı yeni alternatif protein kaynaklarını da gerekli kılmaktadır (Çetiner ve Bilek, 2018). Büyüyen dünya nüfusu bitkisel proteinlerin daha verimli kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir (Day, 2013). Hayvansal kaynaklı gıdaların yüksek miktarda tüketilmesinin bazı sağlık problemlerine neden olduğu belirtilmektedir (Pimentel vd., 1975). Örneğin; serum kolesterolünün yüksek olması ile ilişkilendirilen koroner kalp hastalığı riskinin hayvansal kaynaklı gıdaların yüksek miktarda kolesterol ve doymuş yağ asidi içermesi ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Pimentel vd., 1975). Aynı zamanda bitkisel proteinlerin serum kolesterolünü düşürdüğü bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Jenkins vd., 2000). Alternatif protein kaynaklarının keşfedilmesinde bir diğer etken olan jelatin, BSE gibi hayvansal kaynaklı proteinlere olan güvenin azalması da sürdürülebilir bir diyeteye geçişi beraberinde getirmektedir (Aiking, 2011). Dolayısıyla, bitkisel protein kaynaklarının çeşitliliği nedeniyle hayvansal proteinlere iyi bir alternatif olduklarını söylemek mümkündür (Moure vd., 2006).

Günümüzde dünya nüfusunun protein ihtiyacının %70'i bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018). Aynı miktarda bitkisel ve hayvansal protein üretmek için gerekli olan ekim alanı dikkate alındığında bitkisel protein yetiştirmek için toprağın % 10'u gibi daha az bir oranı gerekmektedir (Day, 2013). Ayrıca hayvansal proteinlerin üretimi eşit miktarda bitkisel protein üretiminden yaklaşık olarak 100 kat daha fazla su gerektirmektedir (Pimentel ve Pimentel, 2003). Dolayısıyla, sürdürülebilirlik bağlamında da bitkisel proteinlere yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018).

Bitkisel protein kaynaklarının iki temelini tahıllar ve yağlı tohumlar oluşturmaktadır (Erickson, 2015). Yağ endüstrisinden elde edilen yağı alınmış protein kaynaklarına özel bir ilgi gösterilmiştir ve ayçiçeği, kanola ve kolza tohumu gibi yağlı tohumların küspelerinden elde edilen proteinlerin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır (Aydemir vd., 2014.). Yağı alınmış tohumların küspelerinde % 35-60 oranları arasında değişen miktarlarda protein bulunmaktadır ve tahıllar yağlı tohumlara göre % 10-12 daha az oranda protein içermektedir (Erickson, 2015). Ancak tahılların üretim miktarının yağlı tohumlara göre daha fazla olması onları oldukça önemli bir bitkisel protein kaynağı haline getirmektedir. Doğada bolca bulunmaları nedeniyle bitki yaprakları ve bitkiler üzerinde yaşayan algler de bitkisel proteinlere kaynak olma açısından oldukça önemlidir (Erickson, 2015). Yağlı tohumların küspelerinden elde edilen proteinlerin yanı sıra alternatif fonksiyonel protein kaynakları olarak değerlendirilmek üzere yer fıstığı küspesi ve hurma meyvesi unu proteinlerinden biyoaktif, yenilebilir film yapımı ve fonksiyonel özellikleri üzerine çalışılmıştır (Aydemir vd., 2014).

Tahıllar, bakliyatlar, yeşil sebzeler ve yağlı tohumlar bitkisel protein kaynaklarıdır (Çetiner ve Bilek, 2018). Çeşitli bitkisel kaynaklardan protein eldesine yönelik çalışmaların giderek hız kazanmasıyla beraber bitkisel protein kaynağı olarak günümüzde yaygın kullanılan bitki soyadır (Nguyen ve Dao, 2017). Soya fasulyesinden elde edilen protein izolatları, konsantreleri ve hidrolizatları; et ve süt ürünleri, bebek formülasyonları, fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler gibi gıda endüstrisinin farklı alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydemir vd., 2014.). Soya proteini dünyada en yaygın olarak kullanılan bitkisel protein olmakla beraber buğday gluteni, kolza, pamuk, mısır, yer fıstığı ve ayçiçeği proteinleri de yaygın bir

şekilde kullanılan bitkisel protein kaynaklarıdır; kinoa ve cevizden elde edilen bitkisel proteinler de mevcuttur (Nguyen ve Dao, 2017; Moure vd., 2006).

Bezelye, yetiştirilme alanının geniş olması ve kabuğunun kolay bir şekilde ayrılabilmesi gibi nedenlerden dolayı bakliyatlar arasında ticari olarak en çok kullanılan bitkisel proteindir (Day, 2013). Bezelye proteinlerinin % 65-80'lik kısmını oluşturan legumin (11S globülin) ve visilin (7S globülin) depo proteinleri, yüksek emülsifiye edici özellik göstermektedirler (Liang ve Tang, 2013). Bezelye proteinlerinin sahip olduğu yüksek fonksiyonellik özellikleri birçok alanda kullanılmalarını sağlamaktadır (Sandberg, 2011). Örneğin; bezelye ve yulaf proteini izolatu ile üretilen krakerlerin, ticari olarak üretilen krakerlere göre besleyici ve dokusal özelliklerinin daha iyi olduğu belirtilmektedir (Morales-Polanco vd., 2017). Bununla beraber yağı alınmış ayçiçeği posası ve pirinç kepeği gibi yan ürünlerden protein eldesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Hourigan vd., 1997).

Bitkisel proteinler gıdaların besin değerlerinin zenginleştirilmesi, fonksiyonel gıda ve gıda takviyesi üretimi ve aroma artırıcı olarak kullanılabilmesi ile ticari olarak kullanılan peynir altı suyu proteinlerine alternatif oluşturmaktadır (Clemente, 2000). Bitkisel kaynaklı proteinler; besin değerleri, biyolojik etkinlikleri, emülsifiye edici aktiviteleri, köpük ve jel oluşturmaları, yağ, su ve lezzet bağlayıcılıkları gibi birçok farklı nedenden dolayı gıda sistemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel proteinler iyi film oluşturma özellikleriyle yenilebilir film ve plastik ambalaj malzemelerine alternatif olarak biyolojik olarak parçalanabilen ambalaj malzemelerinin geliştirilmesinde potansiyel malzemelerdir (Aydemir vd., 2014.).

Tarımda üretilen proteinin % 35'i gıda olarak kullanılırken kalan protein yem olarak ya da diğer sektörlerde kullanılmaktadır; bir kısmı ise hiç kullanılmamakta ve atığa dönüşmektedir (Sari vd., 2015). Bitkisel protein pazarının hızla büyümesi nedeniyle yağlı tohumlar, meyve ve sebzeler, tahıllar ve soyaya alternatif baklagiller ve bunların işlenmesiyle oluşan atıkların ticari protein kaynağı olarak değerlendirilmesinde büyük bir rekabet vardır (Aydemir vd., 2014.). Gıda endüstrisi; bitkisel proteinleri kullanarak yeni ürünlerin geliştirilmesi, gıdaların muhafazası ve atıkların azaltılması konularında araştırmalar yaparak sürdürülebilir bir geleceğe de katkıda bulunabilir (Aiking, 2011). Bu nedenle hem yüksek miktarlarda bitkisel protein üretmek hem de israfı önlemek

için ileri atık değerlendirme araştırmalarının yapılarak bulguların hayata geçirilmesi hem ülkemiz hem de global popülasyon açısından önemlidir.

1.5.1. Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyonu

Bitkisel proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerine çalışılabilmesi için proteinin diğer proteinlerden ve protein olmayan moleküllerden ayrılması gerekmektedir. Proteinlerin kendine özgü olan amino asit bileşimi ve yüzey hidrofobikliği gibi özellikleri nedeniyle farklı ekstraksiyon yöntemleri farklı protein izolatlarını ya da konsantrelerini vermektedir (Karaca, Low ve Nickerson, 2011). Gıda yan ürünlerinden, uygun özütleme/çöktürme yöntemleri ile protein ekstraktları üretilmektedir. Alkali ekstraksiyonu/izoelektrik çöktürme, asit ekstraksiyonu, su ekstraksiyonu, tuz ekstraksiyonu ve ultrafiltrasyon metotları bitkisel atık posalarından proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerdir (Boye vd., 2010). Bitkisel proteinlerin çoğu alkali ortamda çözündüğünden dolayı alkali ortamda süpernatanttan protein ekstraktı elde edilmektedir (Escamilla-Silva vd., 2003). Ancak alkali yöntem ile düşük verimli protein eldesi sağlandığı için izoelektrik noktada çöktürme ile proteinleri süpernatanttan ayırma işlemi de sıklıkla uygulanmaktadır (Rodsamran ve Sothornvit, 2018).

Yeni teknolojilerin kullanılmasının protein ekstraksiyonunda verimi artırdığı belirtilmektedir (Sarkis vd., 2015). Gıda atıklarından protein ekstraksiyonunda verimi artırmak için alkali yöntem dışında enzim, ultrases, mikrodalga, vurgulu elektrik alan ve süperkritik akışkan gibi yaklaşımlar da bulunmaktadır (Görgüç, 2018). Bu yöntemler ekstraksiyon işleminin süresini azaltmakta, ürün kalitesini artırmakta ve Maillard tepkimelerini de kontrol altında tutmaktadır (Ohshima, Sato ve Saito, 1995).

Mikrodalga ile ekstraksiyon yönteminde; bitkinin hücre matrisinde bulunan su, mikrodalga enerjisini absorbe ederek hücrenin içten ısınmasını ve hücre yapısındaki bileşenlerin matris dışına geçişini hızlandırarak hücrenin parçalanmasını sağlamaktadır (Wang ve Weller, 2006). Bu yöntemde çözücü tipi, mikrodalga gücü, işlem süresi ve sıcaklık ekstraksiyon performansını etkileyen parametrelerdir (Madej, 2009). Mikrodalga ile ekstraksiyon susam, elma, pirinç kepeği ve kabak çekirdeği gibi farklı materyallerde çalışılmıştır (Jiao vd., 2014). Ultrafiltrasyon yönteminde proteinler partikül büyüklüğü ya da molekül ağırlıklarına göre diğer maddelerden ayrılmaktadır (Romero-Baranzini vd., 1995). Vurgulu elektrik alan yönteminde hücre

membranlarına kritik elektriksel potansiyel uygulanarak dokunun parçalanması ve geçirgenliği artırılıp proteinlerin hücre dışına aktarılması hızlandırılmaktadır. Yüksek voltaj ile ekstraksiyon yönteminde, iki elektrot arasında üretilen yüksek voltajlı elektriğin boşalmasıyla birlikte bitkisel dokuya yoğun bir enerji akışı sağlanmakta ve böylece kütle transferi hızlanmaktadır (Rosello-Soto, vd., 2015).

Ultrases yönteminde, 20 kHz ve 1 GHz aralığında frekansa sahip olan ses dalgaları sayesinde bitki hücresinin duvarı etkilenmekte ve matraste bulunan bileşenlerin hücre dışına geçişi hızlanmaktadır (Alupului, Calinescu ve Lavric, 2009). Ultrases dalgalarının oluşturduğu ultrasonik enerji, sıvı ortama geçerek iç basıncı artırmakta ve küçük kabarcıkların oluşumunu hızlandırmaktadır. Küçük kabarcıkların patlamasıyla kabarcıkların iç yüzeyi çok yüksek sıcaklık ve basınç değerlerine ulaşmakta ve hedef bileşenin matriksten salınmasını sağlamaktadır (Jambrak vd., 2009). Ultrases teknolojisinin gıda endüstrisine entegre edilmesiyle bitkisel kaynaklardan yüksek katma değerli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu yaygınlaşacaktır (Görgüç, 2018).

Enzimatik ekstraksiyon yönteminde; özellikle karbohidrazlar (selülaz, pektinaz) ile bitkisel kaynaktaki polisakkarite bağlı olan proteinler serbest duruma geçirilerek ekstraksiyon verimi artırılmaktadır (Hourigan vd., 1997). Karbohidrazlar dışında alkalaz, flavorzim ve protizim gibi proteaz enzimlerinin de ekstraksiyon verimini artırmak amacıyla kullanıldığı belirtilmektedir (Hanmoungjai, Pyle ve Niranjan, 2001). Ekstraksiyon işleminin daha düşük sıcaklıkta gerçekleşmesi, patlayıcı çözücü kullanılmaması ve zararlı atık madde üretilmemesi bu yöntemin diğer avantajlarıdır (Hanmoungjai, Pyle ve Niranjan, 2001). Bitkisel proteinler enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile elde edildiklerinde düşük viskozite ve yüksek çözünürlük özelliği gösterdikleri için fonksiyonel bir bileşen olarak birçok gıda ürününde kullanılmaktadır (Adler-Nissen, 1979). Farklı bitkisel kaynaklardan protein ekstraksiyonunda; karbohidrazlardan viskozim L'nin, proteazlardan ise alkalaz enziminin en verimli enzimler olduğu belirtilmektedir. Viskozim L, arabanaz, selülaz, ksilanaz ve hemiselülaz gibi birden fazla karbohidrazı içermektedir (Hourigan, vd., 1997).

1.5.2. Yağlı Tohum Proteinleri

Yağlı tohum proteinleri insan beslenmesinde genellikle birincil protein kaynağı olarak kullanılmamaktadır (Arntfield, 2000). Bununla beraber, yağlı tohumların önemli miktarda olan protein içermeleri dolayısıyla insan beslenmesi için kullanım

potansiyelleri bulunmaktadır (Moure vd., 2006). İçeriği nedeniyle en çok kullanılan ve bilinen bitkisel protein soya proteini olmakla beraber; ayçiçeği, kanola, mısır, aspir, yer fıstığı, susam, pamuk ve keten tohumu proteinleri kullanılan diğer yağlı tohum ürünleridir (Rodrigues, Coelho ve Carvalho, 2012).

Yağlı tohum proteinlerini; biyolojik olarak aktif proteinler ve yağlı tohumlardaki en önemli proteinler olan yapısal ya da depo proteinleri olmak üzere iki sınıfta incelemek mümkündür (Arntfield, 2000). Yapısal proteinler insan beslenmesi açısından oldukça önemli olan proteinlerdir. Biyolojik olarak aktif proteinlere enzimler örnek gösterilebilir. Yağlı tohumların içerdiği depo proteinlerine ise cruciferin/12S protein, zein, 11S protein, arachin, carmin, α -globulin, glycinin ve helianthin örnek gösterilebilir (Hüriyet, 2014).

Yağlı tohumların protein miktarı değişmektedir; soyanın protein içeriği % 37 iken asperde % 13-17 oranında protein bulunmaktadır. Ancak yağlı tohum proteinleri birbirine yapısal benzerlikler göstermektedir. Buna örnek olarak hasat edilen tüm yağlı tohumların içeriğinde suda çözünen albuminlerin, tuzda çözünen globulinlerin ve alkalide çözünen glutenlerin bulunması ve dört adet aynı protein fraksiyonunu içermeleri gösterilebilir (Moure vd., 2006; Rodrigues, Coelho ve Carvalho, 2012).

Yağlı tohumların dünya bitkisel protein ihtiyacını karşılama oranları; soya için % 69, kolza için % 12.4, pamuk çiğidi için % 6.9, ayçiçeği tohumu için % 5.3, yer fıstığı için % 2.8 olarak belirtilmektedir (Moure vd., 2006). Küresel olarak soğuk presleme ile yağ üretiminin giderek artmasıyla yağ alınmış bitki posaları birikmekte ve bu durum sonuç olarak yağlı tohum posalarından bitkisel protein ürünlerinin üretilmesine yol açmaktadır (Çakır ve Gülseren, 2019).

1.5.3. Çörek Otu Proteinleri

Tıbbi bitkiler arasında oldukça sık kullanılan bitkilerden olan çörek otu bitkisinin aktif bileşenlerinin kaynağı, bitkinin tohumu ve tohumdan elde edilen yağlarıdır (Goreja, 2003). Hasat mevsimi, ürün çeşidi ve ürünün yetiştirildiği iklime göre değişmekle beraber çörek otu tohumlarında % 20.2 ham protein ve proteinlerin yapı taşı olan bazı aminoasitlerin bulunduğu belirtilmektedir (Vatansever vd., 2013). Yağ alınmış çörek otu tohumundan üretilen protein konsantresinin esansiyel amino asit içeriği ağırlıkça yaklaşık olarak % 33 oranında; protein miktarı ise % 54 olarak bulgulanmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019).

Proteinler hakkında fonksiyonel bilgilerin yapısal ve dizilimsel açıklamaların bulunduğu Uniprot Knowledgebase’de (UniProtKB) 5 adet değerlendirilmiş 22 adet ise değerlendirilmemiş çörek otu proteini olduğu belirtilmektedir (Anonim, t.y.). Bunlardan defensin D1, defensin D2, thionin NsW1, thionin NsW2 ve non-specific lipid-transfer protein 1 değerlendirilmiş proteinlerdendir. Bu proteinlerin moleküler fonksiyonları genel olarak genel olarak antibiyotik, antimikrobiyal ve fungusit etkiler olarak raporlanmıştır.

Çörek otunun amino asit içeriğini belirlemek için yapılan bir çalışmada glutamik asit, aspartik asit, lösin, glisin ve arjinin amino asitlerinin en yüksek oranda bulunduğu belirtilmekte ve amino asit içeriği oranları % 22.4 glutamik asit, % 10.05 aspartik asit, % 9.18 arjinin, % 6.92 lösin, % 6.86 glisin, % 6.07 pirolin, % 5.10 valin, % 4.21 alanin, % 4 fenilalanin, % 3.98 isolösin, % 3.95 treonin, %3.91 lizin, % 3.8 serin, % 3.35 tirozin, % 2.83 histidin, % 1.45 metionin, % 1.17 sistin ve % 0.77 triptofan olarak verilmektedir (Al-Gaby, 1998).

Çörek otu tohumunun yağı üzerine daha çok araştırılma yapılmasından dolayı biyoaktif özelliklerinin çoğu, yağında bulunan timokinon ve uçucu yağ bileşenlerine atfedilmiştir (Hadi, Mohammed ve Hameed, 2016). Protein bileşenlerinin biyoaktif özellikleri ise çok daha az araştırılmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019). Çörek otu proteinlerinin biyoaktif özelliklerinin araştırılması ve çörek otunun yağı alınmış posasından elde edilecek katma değerli protein ürünleri üretilmesi hem sürdürülebilir çevre politikasına hem de ülke ekonomisine katkı sağlanması açısından oldukça önemlidir. Uzun yıllardır geleneksel halk tıbbında bitkisel bir kaynak olarak kullanılan çörek otu proteinlerinin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

1.6. Biyoaktif Peptitler

Beslenme ile alınan diyet proteinleri esas olarak hücrel bakım, büyüme ve enerji için temel amino asit kaynağı olarak kabul edilmektedir (Ryder vd., 2016). Bununla beraber; yakın geçmişte, diyetel proteinlerin tüketimden sonra gastrointestinal kanalda bulunan proteazlar tarafından hidroliz edilmesiyle ortaya çıkan biyoaktif özellikleri tanınmıştır (Fitzgerald, Murray ve Walsh, 2004).

Biyoaktif peptitler, insan vücudunda faydalı fizyolojik etkilere neden olabilen protein hidrolizatlarıdır (Möller vd., 2008). Biyoaktif peptitlerin alımı, beslenme etkisine ek olarak; vücut fonksiyonları veya koşulları üzerinde olumlu etkiye neden olarak sağlığın geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Ryder vd., 2016). Biyoaktif peptitler güvenilir olmaları ve sağlığı artırıcı etkileri nedeniyle fonksiyonel gıda uygulamalarının kilit bir kategorisidir ve nutrasötiklerde bileşen olarak kullanılabilirler (Lahrichi, vd., 2013; Meisel ve Fitzgerald, 2003). Aynı zamanda antibiyotik ilaçlarda antimikrobiyal olarak ve antiviral, antifungal, antiparaziter ilaçların geliştirilmesinde de rol oynamaktadır (Mooney, vd., 2012). Diyetel bir peptidin biyoaktif kabul edilebilmesi için fizyolojik düzeyde ölçülebilir biyolojik bir etki sağlaması gerekir. Bu biyoaktivite sağlığı faydalı bir şekilde etkileme potansiyeli taşımaktadır (Moller vd., 2008).

Biyoaktif olan peptitler ana protein içerisinde gizli ve genellikle etkisiz olduklarından aktif olabilmeleri için ortaya çıkarılmaları gerekir (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Proteinlerin birincil yapılarında aktif olmayan biyoaktif peptitler; fermentasyon, gıda işleme prosesi, *in vitro* olarak enzim tarafından katalizlenen proteoliz veya sindirim sonucu ortaya çıkmaktadır (Hartmann and Meisel 2007). Raporlanmış çoğu BAP, *in vitro* enzimatik hidroliz veya fermentasyon yoluyla üretilmiştir. Uygun bir gıda proteini seçildikten sonra, ilgili peptitleri serbest bırakmak için tek veya çoklu spesifik veya spesifik olmayan proteazlar kullanılarak enzimatik hidroliz uygulanması oldukça sık başvurulan bir yöntemdir (Udenigwe ve Aluko, 2012).

Sığır sütü, peynir ve süt ürünleri, gıdalardan elde edilen en büyük biyoaktif peptit kaynaklarıdır (Torres-Llanez vd., 2005). Bununla birlikte; sığır kanı (Przybylski vd., 2016), jelatin (Lassoued vd., 2015), et, yumurta, ton balığı, sardalya, ringa balığı ve somon gibi çeşitli balık türleri gibi diğer hayvan kaynaklarından da elde edilebilirler (Sanchez ve Varguez, 2017). Bitkisel kaynaklar olarak ise buğday, mısır, soya, pirinç, mantar, kabak, sorgum ve amarant örnek gösterilebilir (Sanchez ve Varguez, 2017). Protein bakımından zengin bir diğer kaynak olan erik (*Prunus domestica* L.) çekirdeğinden alkalaz hidrolizi ile antioksidan ve antihipertansif aktiviteler gösteren ve gıda ve ilaç endüstrisi için faydalı ucuz bir biyoaktif peptit kaynağı olabilecek 13 peptit (MLPSLPK, HLPLL, NLPLL, HNLPLL, KGVV, HLPLL, HGVLQ, GLYSPH, LVRVQ, YLSF, DGVVQ, GLYSPH, LVRVQ, YLSF, DPV) elde edilmiştir (González-García vd., 2014). Süt proteininden elde edilmiş peptitlerden

kasomorfinler, α -laktorfin, β -laktorfin ve laktoferoksinlerde opioid etki; kasokinlerde opioid etki ve ACE-inhibitörü etkisi; immunopeptitlerde immunomodulator etki; laktoferrisinlerde antimikrobiyal etki; kasoplatelinlerde antitrombotik etki; fosfopeptitlerde mineral bağlayıcı etki gözlenmiştir (Meisel, 1998). 2,5-Diketopiperazinler (DKP) de biyoaktif peptitler olarak büyük ilgi görmüştür (Sanchez ve Vazquez, 2017).

Bir peptidin kimyasal yapısı ile aktivitesi arasındaki ilişki tamamen çözülememiş olmakla beraber peptidin aktivitesi; yapısına yani amino asit kompozisyonuna C-terminal amino asit tipine, peptit zincirinin uzunluğuna, peptidi oluşturan amino asitlerin yük karakterine, peptidin hidrofobik ve hidrofilik özelliklerine bağlıdır. Biyoaktif peptitler büyük, orta ve küçük zincirli peptitler olabilir ancak kısa zincirli peptitler (2-6 aminoasit) en büyük kategoriyi temsil eder (Lahrichi, vd., 2013). Vücuda alındığında biyolojik olarak önemli bir aktiviteye sahip olan biyoaktif peptitler ise kısa amino asit zincirleri olarak tanımlanmaktadır (Lafarga ve Hayes, 2014). Peptit dizilerinin küçük boyutlarda olması sindirim esnasında parçalanma eğiliminin daha az olmasını sağlar (Segura-Campos vd., 2011). Peptit dizisinde hidrofobik uç sayısının artması ise partiküle bağlanan miktarının da artmasına neden olarak biyoyararlanımlarını arttırmaktadır. Bu nedenle küçük peptitlerin etkinlikleri birçok *in vitro* çalışmada belirlenmiştir (Segura-Campos vd., 2011). Örneğin; ACE-inhibe etkisi yüksek olan peptitler genellikle daha fazla C-terminalinde aromatik veya bazik N-terminal amino asitlere, daha yüksek miktarda hidrofobik ve pozitif yüklü amino asitlere sahiptir (Lí ve Yu, 2015). Tüm bunlarla beraber daha önemli olan bir diğer konu ise bahsedilen faydaların görülebilmesi için biyoaktif peptitlerin sindirim sisteminden ilk geçişi yapabilmesidir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2007). Diyetle alınan proteinlerin pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi sindirim enzimleriyle gerçekleşen hidrolizi sonucunda ortaya çıkan biyoaktif peptitler, bağırsaktan emilerek kan dolaşımında güçlü ve sistemik etkiler yaratabilir ya da gastrointestinal sistemde lokal etkiler meydana getirebilir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2007).

Biyoaktif peptitler; mineral bağlama, immünomodulator, antimikrobiyal, antikarsinogenik, antioksidan, antitrombotik, hipokolesteromik ve antihipertansif etkiler ve çeşitli etkiler sergileyebilir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2007). Bilinen biyoaktif peptitlerin birçoğu çoklu işlevlilik göstermektedir ve bu nedenle belirtilen etkilerin birden fazlasını gösterebilmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Gıda

protein hidrolizatlarının biyoaktivite potansiyeli, enzim inhibisyonu bağlamında, genellikle yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC₅₀) ile belirlenmektedir (Nongonierma vd., 2017).

Talasemi gibi düzenli kan nakli gerektiren hastalıklarda transfüze edilen kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasıyla salınan demirin fazlası karaciğer ve dalak gibi organlarda veya miyokard (kalp kası) gibi yapılarda, hemosiderin ve ferritin olarak depolanmaktadır (Ebrahimzadeh, Pourmorad ve Bekhradnia, 2008). Demirin birikmesi toksik miktarlara ulaştığında ise doku hasarına neden olarak; kalp yetmezliği, diyabet, endokrin anormallikleri, hipotiroidizm, karaciğer yetmezliği ve erken ölüme varacak kadar ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır (Rund ve Rachmilewitz, 2005). Bu nedenle talasemi, aşırı demir yüküne yol açması nedeniyle reaktif oksijen türlerinin daha da kuvvetlenmesiyle organlara, özellikle kardiyovasküler sisteme, verdiği hasarlar ile karakterizedir (Shinar ve Rachmilewitz, 1990).

Oksidatif stresin kırmızı kan hücrelerine vereceği zararın önüne geçmek amacıyla antioksidanlar ve destekleyici tedaviler kullanılmaktadır (Kukongviriyapan vd., 2008). Demir şelatörleri; dokularda biriken demir ile, dışkıda ve/veya idrarda çözünür kararlı kompleksler oluşturarak vücuttan atılmalarını sağlar. Yapılan şelasyon tedavisi ile demir fazlalığından kaynaklı komplikasyonlar azalır ve hastanın yaşam kalitesi artırılmış olur (Shinar ve Rachmilewitz, 1990).

Kullanılmakta olan mevcut şelatörler; biyoyararlanımlarının zayıf olması ve şiddetli yan etkileri yetersiz kalmalarına neden olmaktadır (Kukongviriyapan vd., 2008). Demir şelatlama ajanlarının nispeten az olmaları da dikkate alındığında, en az zararlı azami fayda sağlayacak yeni kaynakların araştırılmasında büyük çaba sarfedilmesi potansiyel yeni kaynakların bulunması açısından oldukça anlamlıdır (Hosseinimehr vd., 2007).

İnsanlık tarihinde binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde bitki özleri kullanılmaktadır. Günümüzde de çeşitli bitkisel materyaller hastalıklarla mücadele de önemli kaynaklardan olmaya devam etmektedir (Ebrahimzadeh, Pourmorad ve Bekhradnia, 2008).

Örneğin; pepsin ve pankreatin enzimleri ile üretilen nohut protein hidrolizatlarının, afinite ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmasından sonra demir şelasyon

aktivitelerinin belirlendiği bir çalışma yapılmıştır (Torres-Fuentes, Alaiz ve Vioque, 2012). Demir şelasyon aktivitesinin, saflaştırılmış peptit fraksiyonlarında hidrolizatlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ek olarak; histidin içeriğinin ve demir şelatlama aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir. Histidin içeriğinin % 20'nin üzerinde olan fraksiyonlarda en yüksek şelatlama aktivitesinin gözlendiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar, demir şelatlayıcı peptitlerin pepsin ve pankreatin enzimleriyle nohut proteinlerinin hidrolizinden sonra açığa çıktığını göstermektedir. Metal şelasyon yoluyla bu peptitlerin demir znrlğn, emilimini ve biyoyararlanımı arttırabileceği de belirtilmektedir (Torres-Fuentes, Alaiz ve Vioque, 2012).

Çörek otu tohumlarının anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-astım ve antihipertansif gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri sahip olduğu belirtilmektedir (Randhawa, 2008). Ayrıca rek otu tohumlarının iyi bir antioksidan kaynağı olduğu bildirilmektedir (Salem, 2005). Bu aktiviteler ağırlıklı olarak çörek otu yağının etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Çörek otu proteinleri ile ilgili çalışmalar nispeten kısıtlıdır. Dolayısıyla rek otu tohumlarının potansiyel bir biyoaktif protein kaynağı olma potansiyeli incelenmelidir (Trigui vd., 2019).

Fizyolojik olarak aktif peptitler hakkında gittikçe artan bilgiler gıda proteinlerinin son yıllarda artan bir değer kazanmasını sağlamaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Buna bağlı olarak protein içeren atıklardan biyoaktif peptidlerin üretimi de giderek poplerleşmektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Bu durum, atıkların kullanılmasında ve değerlendirilmesinde artış sağlamaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Bitkisel atık proteinlerinin fonksiyonel sağlık etkileri birçok çalışmada incelenmiştir (Siow ve Gan, 2014). Bitkisel atıklardan elde edilen biyoaktif peptitlerde incelenen etkiler arasında en belirgin olarak antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyen), antikarsinojenik ve antidiyabetik aktivitelerde etki gözlenmiştir (Eryılmaz, 2016). Çalışmamızda soğuk preslenmiş çörek otu posasından protein konsantresi eldesi ve bu konsantrenin enzimatik hidrolizi ile bitkisel kaynaklı biyoaktif peptitlerin araştırılması ve eldesi amaçlanmaktadır.

1.6.1. Proteolitik Hidroliz ve Enzim Dışı Yöntemler

Biyoaktif peptitler; bitkilerden, hayvanlardan ya da mikroorganizmalardan gelen proteolitik enzimler kullanılarak *in vitro* enzimatik hidrolizle, gastrointestinal sindirim simüle edilerek *in vivo* enzimatik hidrolizle, kültürler kullanılarak fermentasyon yoluyla ve kimyasal sentez yoluyla (enfuvirtid vb.) üretilmektedir (Agyei ve Danquah, 2011). Bu yöntemler kombine bir şekilde de kullanılabilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018). Hidrolizden sonrası izolasyon ve saflaştırma aşamaları gerçekleştirilerek biyoaktif peptitler elde edilmektedir (Agyei ve Danquah, 2011).

Gıda proteinlerinden biyoaktif peptitlerin üretilmesinde kullanılan en yaygın yöntemler, enzimatik hidroliz veya fermantasyon olmakla beraber, enzimatik hidroliz daha çok kullanılmaktadır (Lee ve Hur, 2017). Enzimatik hidroliz, özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde, organik çözücü ve toksik kimyasallar içermemesinden dolayı tercih edilmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bu nedenle protein materyalinden belirli bir sıcaklık ve pH'da enzimatik hidroliz yoluyla protein hidrolizatlarının hazırlanması günümüzde önemli bir araştırma alanı olmuştur.

Proteinlerin enzimatik hidrolizi; amino asitlerden ve peptitlerden proteinleri oluşturan peptit bağlarının bölünmesiyle gerçekleşmektedir. Elde edilen hidrolizat ise amino asit ve peptit karışımından oluşmaktadır (Ulagesan, Kuppusamy ve Kim, 2018). Gıda kaynaklı proteinlerin enzimatik hidrolizi sırasında biyoaktif peptitlerin salınımını; protein tipi ve konsantrasyonu, enzim hazırlama ve konsantrasyonu, çözücü, pH ve iyonik kuvvet gibi içsel faktörler ya da sıcaklık ve basınç gibi dışsal faktörler etkileyebilmektedir (Nongonierma vd., 2017). Örneğin; peptit bağının bölünebilmesi için enzimin seçiciliği, pH veya substrat konsantrasyonu ile bağlantılı olabilir (Butre vd., 2015). Bu nedenle etkili biyoaktif hidrolizatların oluşumu için çok faktörlü deney tasarımı ve yüzey yanıt metodolojisi ile optimum hidroliz parametreleri belirlenebilmektedir (Contreras vd., 2011).

Gıda proteinleri genellikle tripsin, pepsin, kimotripsin, bromelain, fisin veya papain gibi enzimler kullanılarak hidrolize edilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018). Bitkisel ve hayvansal kaynaklı yaygın olarak kullanılan enzimler α -kimotripsin ve papain enzimleridir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bazı çalışmalarda nötraz, termolisin, pepsin, alkalaz, pronaz, karboksipeptidaz A ve tripsin enzimlerinin proteolitik hidroliz için uygun olan pH ve sıcaklık koşulları altında olduğu belirtilmektedir. Yaygın olarak

kullanılan mikrobiyal kaynaklı proteazlar, laktik asit bakterilerinden olan *Bacillus* spp. ve *Bifidobacterium*'dan elde edilmektedir (Pedroche vd., 2007). Mikrobiyal kaynaklı proteazların diğer kaynaklardan elde edilen proteazlara karşı bazı avantajları bulunmaktadır. Minimum besin ihtiyacı ve olgunlaşma süresinin kısa olması nedeniyle mikroorganizmaları yetiştirmek nispeten daha az maliyetlidir; ikincisi özellikle LAB bakterileri olmak üzere çoğu mikroorganizmanın proteazları hücre zarından alındığı için saflaştırma nispeten daha az maliyetlidir; son olarak ise mikrobiyal kaynaklı proteazlar doğada bulunan mikroorganizmalar kadar çeşitlidir (Gobbetti, Smacchi ve Corsetti, 1996). Kullanılan enzim türüne bağlı olarak peptit dizileri ve biyolojik etkinlikleri değişebilmektedir. Bununla beraber hidroliz derecesinin iyi bir düzeyde olması için ise enzim/substrat oranı dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Mojica ve Mejía, 2017). Kısa peptit zincirleri içeren hidrolizatların üretilmesinde, enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarına bağlı olarak, birden fazla proteolitik enzim kullanılabilir (Khiari, Ndagijimana ve Betti, 2016). Elde edilen hidrolizatların biyolojik aktiviteleri değerlendirildikten sonra en güçlü sekansların bulunması amacıyla saflaştırma ve tanımlama işlemleri gerçekleştirilir (Chakrabarti, Guha, ve Majumder, 2018).

Enzimatik hidroliz; yüksek ürün kalitesi ve verimi, son üründe kalıntı toksik kimyasalların ve organik çözücülerin bulunmaması, istenmeyen ürün miktarı düşüklüğü ve ılımlı reaksiyon koşullarıyla kimyasal senteze göre avantajlara sahiptir (Sarmadi ve İsmail 2010). Ayrıca reaksiyon süresinin daha kısa olması, ölçülebilirliğinin kolaylığı ve daha öngörülebilir olması nedenleriyle mikrobiyal fermentasyondan daha fazla tercih edilmektedir (Sangsawad, Roytraku ve Yongsawatdigul, 2017).

Mikrobiyal fermentasyon, bazı bakteri veya mayaların büyüdükçe proteinleri enzimleriyle hidroliz etmeleri için protein substratları üzerinde kültürlenmesini içermektedir. Hidrolizin derecesi ise kullanılan suşa, protein tipine ve fermentasyon süresine bağlıdır. Elde edilen protein hidrolizatlarının işlevselliği ise mikroorganizmaların farklı proteolitik enzimlere sahip olmalarından dolayı farklılık göstermektedir (Daliri, Oh ve Lee, 2017). Kullanılan mikroorganizmanın proteolitik potansiyelini arttırmak için ekim koşulları kontrol edilebilir (Marugg vd., 1995).

Sonuç olarak gıda proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptit sayısı; enzim tipi ve kullanılan mikroorganizma(lar) gibi faktörlerin optimize edilmesiyle ya da mikrobiyal fermantasyonun enzimatik hidroliz ile birleştirilmesiyle artırılabilir. Enzimatik hidroliz reaksiyon ortamı, enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarına göre ayarlanmasıyla reaksiyonda bir dizi enzim kullanılması mümkündür (Agyei ve Danquah, 2011). Enzimatik hidroliz sırasında potansiyel biyoaktif peptitlerin salınımının artırılmasıyla daha yüksek biyoaktif etki elde edilebilmektedir. Çörek otu proteinlerini hidrolize etmek amacıyla çalışmamızda, sahip olduğu üstünlükler nedeniyle enzimatik hidroliz yöntemi kullanılmıştır.

1.6.2. Papain ve Tripsin Enzimlerinin Kullanımı

Proteaz ya da peptidazlar; protein ve polipeptit zincirlerinin amid bağlarını hidroliz yoluyla parçalayarak amino asitlere dönüştürebilen proteolitik aktiviteye sahip enzimlerdir (Fersht, 1998; Rostika vd., 2018). Protein yapısında olan proteazlar, belli bir sıcaklık ve pH aralığında verimli bir şekilde çalışmaktadırlar (Fersht, 1998).

Bu çalışmada; papain ve tripsin enzimi kullanılmaktadır. Tripsin enzimi, birçok biyoaktif peptit eldesinde kullanıldığı ve gastrointestinal sindirim esnasında biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasını sağlayan bir enzim olduğu için burada da kullanılmaktadır (Sanchez ve Varguez, 2017). Papain enzimi ise çok fazla sayıda ve düşük moleküler ağırlıkta peptit elde edilmesini sağlayarak, biyoaktif özellik gösterme potansiyeli olabilecek peptitlerin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Literatürde de yaygınlıkla değerlendirildiği bilinmektedir.

Endo proteazlar sınıfında yer alan sistein proteazlar; aktif merkezlerinde bulunan sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterizedirler (Bugg, 1996). Papain (EC 3.4.22.2) papaya (*Carica papaya* L.) lateksinden izole edilmiş endolitik bir bitkisel sistein proteazıdır (Amri ve Mamboya, 2012). Papain, olgunlaşmamış papaya derisinin kesilmesi ve daha sonra kesilmiş olan lateksin toplanması ve kurutulmasıyla elde edilir. Meyvenin yeşilliğinin artmasıyla papainin aktifliği arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Meyve ne kadar yeşil olursa papain enziminin de o kadar aktif olmaktadır (Amri ve Mamboya, 2012).

Papain; 1CVZ PDB erişim numarasına, 23.406 Da moleküler ağırlığa, dört disülfür köprüsüne sahip olan, tek zincirli protein yapısında bulunan ve Gln19, Cys25, His158

ve His159'da katalitik etkileri olan bir enzimdir (Robert vd., 1974). Ayrıca çok çeşitli koşullar altında stabil ve aktif kalabilen, yüksek sıcaklıklarda dahi kararlı olabilen bir enzimdir (Cohen vd., 1986). Farklı substratlara göre aktivitesi değişen papain için optimum pH 3.0-9.0 aralığında belirtilmektedir (Edwin ve Jagannadham, 2000). Papain, sülfidril grubu enzim aktivitesi için oldukça gereklidir, üç disülfid köprüsüne sahip olan tek zincirli bir polipeptittir (Rostika vd., 2018). Papain 212 aminoasidin tek bir polipeptidinden oluşmaktadır ve aktif bölgesine 7 amino asit yerleşebilmektedir (Fersht, 1998). Papainin proteolitik aktivitesinin, elastin ve proteoglikanları parçalanması gibi aktiviteler de dahil olmak üzere pepsin ve pankreatinden daha güçlü olduğu belirtilmektedir (Paul vd., 2013). Papain; proteinlere, kısa zincirli peptitlere, amino asit esterlerine ve amid zincirlerine karşı gösterdiği geniş proteolitik etki nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Amri ve Mamboya, 2012). Papain enzimi özellikle bazik amino asitleri (arginin, lisin ve fenilalanin) içeren peptit bağlarını parçalamaktadır (Menard vd., 1990).

Papain enziminin mekanizması, aktif bölgede bulunan üç amino asidin sistein-25 kısmı ile termal amino kısmını serbest bırakan peptit zincirinin omurgasındaki karbonil grubu karbonunu etkileme şeklindedir (Amri ve Mamboya, 2012). Peptit bağlarını koparan bu mekanizma, Cys-25'in His-159 ile etkisiz hale getirilmesidir. Proteinin peptit zincirleri boyunca bu işlem gerçekleştiğinden protein parçalanmaktadır. Asparagin-175 ise bu işlemin gerçekleşmesi için His-159'un imidazol halkasına yönlendirmektedir. Asparagin-175 amino asidi ile beraber bu üç amino asit papain enziminin aktif bölgesinde çalışan ve enzimin kendine özgü fonksiyonlarını sağlamayan amino asitlerdir (Menard vd., 1990).

Papain enzimi, proteinlerin katlanma ve açılma davranışlarını anlayabilmek için iyi bir sistem sağlayan ve iyi tanımlanmış iki alandan oluşmaktadır (Edwin vd., 2002). Papain, molekülün katlandığı üç disülfür köprüsü boyunca dengelenmekte ve enzim stabilitesine katkıda bulunan yan zincirler arasında güçlü bir etkileşim oluşturmaktadır (Edwin ve Jagannadham, 2000). Katalitik yapısı ise amino asitler sistein-25 ve histidin-159'dan oluşmaktadır (Menard vd., 1990).

Bir çalışmada, *Palmaria palmata*'dan papain enzimi hidrolizi ile izole edilen IRLIIVLMPILMA peptidinin sistolik kan basıncını 33 mmHg azalttığı belirtilmiştir (anti-hipertansif etki) (Fitzgerald vd., 2014). Biyoaktif peptitlerin *Tinospora cordifolia*

(Guduchi bitkisi) kökünden ayrılması ve tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen gastrik sindirimin *in vitro* simülasyonunda, proteinlerin hidrolizi için papain ve pepsin enzimleri ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu proseste, papain hidrolizatlarının 27 kDa büyüklüğünde peptitleri verimli bir biçimde oluşturması dolayısıyla bu hidrolizatlar uygun tekniklerle saflaştırılmış ve antioksidan aktivite analizleri uygulanmıştır (Pachaiappan vd., 2018). Papain ile sindirimi gerçekleştirilmiş *T. cordifolia* kök protein fraksiyonlarının; çok yüksek oranda ABTS ve süperoksit temizleme aktiviteleri gösterdiği, düşük moleküler ağırlıklı birden fazla peptit elde edildiği, hidrofobik ve aromatik amino asit kompozisyonuna sahip olduğu için diğer peptitlerden daha fazla serbest radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Papainin gösterdiği aktivite hem endo hem de eksopeptidaz aktivitesi içermesi dolayısıyla çok sayıda peptit üretmesi durumuna bağlanmaktadır (Pachaiappan vd., 2018). Süt proteinlerinin proteolizi ile üretilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivite çalışmasında papain ile hidrolize edilmiş süt örneğinin; tripsin, pepsin, α -kimotripsin ve pepsin-pankreatin enzimleriyle elde edilmiş örneklere kıyasla en yüksek Fe^{+2} şelatlama aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (El-Fattah, 2017). Ovalbüminin papain kullanılarak hidrolize edildiği bir diğer çalışmada hidrolizatların, ACE inhibisyon oranının anlamlı derecede yüksek olan 70.6 ± 1.1 'e ulaştığını belirlemişlerdir (Huang vd., 2015).

Spirulina platensis'ten papain enzimi ile elde edilen peptitlerin amino asit dizisi ve bu peptitlerin biyoaktiviteleri; Lys-Leu-Val-Asp-Ala-Ser-His-Arg-Leu-Ala-Thr-Gly-Asp-Val-Ala-Val-Arg-Ala peptidinin antibakteriyel aktivite (Sun vd., 2015), belirlenmemiş bir diğer peptidin antitümör etki (Suetsuna ve Chen, 2001), Val-Glu-Pro peptidinin ise ACE-I inhibitör aktivite (Lu vd., 2010) gösterdiği şeklindedir.

Sonuç olarak papain, biyolojik ve ekonomik öneme sahip enzimatik bir protein olduğunu göstermiştir (Amri ve Mamboya, 2012).

Endopeptidaz sınıfından olan serin proteazlar, aktif merkezlerinde esansiyel serin dizisi varlığına sahiptirler. Serin proteazlar proteinlerin lizin ve arginin artıklarının karbonil uçlarının spesifik hidrolizini gerçekleştirmektedir. Metabolizmada hormon ve immün sistem aktivitesi, kan pıhtılaşması gibi birçok proseste bulunurlar (Ahsan ve Watabe, 2001).

Serin proteazlar sınıfından olan tripsin enzimi de hidrolitik bir enzimdir (Bisswanger, Nouaimi ve Klaus, 2001). Moleküler ağırlığı ise 23,8 kDa olarak belirtilmektedir (Ahsan ve Watabe, 2001). Tripsin Arg-X, Lys-X bölgelerinden keserek proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir (Bisswanger, Nouaimi ve Klaus, 2001). Tripsinojen adlı aktif öncü protein olarak pankreastan salgılanan tripsin enzimi, bağırsak mukozasından salgılanan enterokinaz enzimi ile aktif forma geçirilir. Oto-katalitik olarak tripsinojenin aktivasyonundan ve kimotripsin, elastaz, karboksi-peptidaz gibi proteazların aktivitesinden de sorumludur (Malmsten ve Larsson, 2000).

Tripsin enzimi katalizinin mekanizması; substrata bağlanma, His-57 tarafından desteklenen Ser-195'ten protein transferiyle peptit üzerinde bulunan bağın karbonil grubuna nükleofilik saldırısıyla peptit bağlarının yıkımı ve ilk ürünün serbest kalması, His-57 ile desteklenen açıl-enzim arasına suyun girmesi ve tetrahedral aranının oluşumuyla açıl aranının çözülmesi ve ikincil ürünün serbest kalması şeklinde gerçekleşmektedir (Perona ve Craik, 1994).

Tripsin enziminin endüstriyel ve medikal kullanım alanları oldukça fazladır; hazımsızlık tedavisinde, insan insülininin yarı sentezinde, insan kanında bulunan serin proteaz inhibitörlerinin belirlenmesinde, süt oksidasyonunun önlenmesinde ve biyoaktif peptitlerin eldesi için hidrolizin sınırlı olarak gerçekleştirilmesinde ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır (Kang vd., 2005). Bununla beraber tripsin, kütle spektrometresi (MS) ile protein kimliği belirleme çalışmalarında en çok kullanılan proteazdır. Tripsin gibi spesifikleri bilinen proteolitik enzimlerin hidroliz özelliklerinden yararlanılarak proteinlerden küçük peptidlerin eldesi gerçekleştirilmektedir (He, Zhong ve Yeung, 2002).

Tripsin enzimi kullanılarak biyoaktif peptit elde edilmesiyle yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; *Spirulina platensis* organizmasından tripsin enzimi ile elde edilen peptitin antitümör etkisine sahip olduğu belirtilmiştir (Zhang ve Zhang, 2013). Yeni bir dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) inhibe edici peptit eldesi için yapılan çalışmada; tripsin ve kimotripsin enzimleri ile keçi sütü kazein hidrolizatlarından DPP-IV inhibe edici peptitlerin izole edildiği ve tanımlandığı belirtilmiştir (Zhang vd., 2015). Süt proteolizi ile üretilen biyoaktif peptitlerin ACE-I inhibitör ve antioksidan aktivite çalışmasında tripsin ile hidrolize edilmiş süt örneğinin, sütteki teknolojik özelliklerde değişikliğe neden olmadan ACE-I inhibitör ve antioksidan aktivite

gösterdiği belirtilmiştir (El-Fattah, 2017). Bir sindirim enzimi olarak insan vücudunda biyoaktif peptitleri üretmesi yönüyle tripsin enzimi ile zararlı yapıları inhibe edici peptitlerin aranması uygun görülmektedir (Tauzin, Miclo ve Gaillard, 2002).

Proteinlerin hidrolizinde papain, tripsin, pepsin, alkalaz enzimlerinin kullanımı giderek artmaktadır (Aspmo vd., 2005). Gıdalardan spesifik biyoaktif peptitlerin üretilmesinde belirli proteolitik enzimlerin kullanıldığı bilinmemekle beraber bazı enzimlerin daha düşük moleküler ağırlıklı biyoaktif peptitler üretme eğiliminde olduğu bilinmektedir (Daliri, Oh ve Lee, 2017). Örneğin; *Achatina fulica* salyangoz ayak kası proteininin papain ve tripsin tarafından hidroliz edildiği örneklerde daha fazla sayıda küçük moleküler ağırlıklı peptit elde edildiği belirtilmektedir (Huang vd., 2017). Bilinen biyoaktif peptitlerin çoğu da gastrointestinal enzimlerden olan pepsin ve tripsin kullanılarak üretilmiştir (Gobbetti, Minervini ve Rizzello, 2004). Örneğin; anjiyotensin-dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe eden biyoaktif peptitler çoğunlukla tripsin kullanılarak üretilmiştir (Meisel ve FitzGerald, 2003).

Düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin (<10 kDa), yüksek moleküler ağırlıklı peptitlere göre daha etkili antioksidan ve antihipertansif peptitler olduğu bilgisinden yola çıkarak; ticari olarak biyoaktif peptitlerin üretilmesinde düşük moleküler ağırlıklı peptitler üreten proteazların seçilmesi faydalı olacaktır (Wattanasiritham vd., 2016).

Göstermiş oldukları biyolojik aktivitelere dayanarak çalışmamız kapsamında çörek otu proteinlerinin proteolitik hidroliziyle biyoaktif peptit eldesinde papain ve tripsin enzimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. DPPH, Fe⁺² şelatlama gibi antioksidatif aktiviteler ve anti-Alzheimer gibi biyoaktif özellikler gösterecek peptitlerin araştırılmasında kullanımları uygun görülmüştür.

1.7. Peptitlerin Fraksiyonlanması

Fraksiyonlama; numune içeriğinin (peptitler, proteinler, metabolitler) kimyasal ve fiziksel özelliklerine dayanarak ve genellikle kromatografi ya da elektroforez kullanarak çeşitli gruplara (fraksiyonlar) ayrılması işlemidir (Issaq ve Veenstra, 2013). Gıda peptitlerin fraksiyonlanmasında günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntemler; ultrafiltrasyon ve iyon değişimi kromatografisi ile jel filtrasyon teknolojilerini içermek üzere sıvı kromatografisidir (Chabeaud vd., 2009; Pedroche vd., 2007).

Yöntemlerin birçoğu laboratuvar ölçeğinde etkin sonuçlar vermektedir. Bununla beraber üretim maliyeti, büyük ölçekli uygulamalar için engel oluşturmaktadır (Agyei ve Danquah, 2011). Peptit bazlı ürünlerin ticarileşmesinde en büyük sınırlayıcı faktör saflaştırma tekniklerinin maliyetidir. Endüstriyel biyoteknoloji işlemlerinde ayırma ve saflaştırma aşamalarının, sermayenin ve işletme maliyetlerinin % 70'ine tekabül edebileceği tahmin edilmektedir (Brady vd., 2008). Bu nedenle biyoaktif peptitlerin eldesine yönelik izolasyon metotlarının işlem zamanı ve maliyetlerinin azaltılması üzerine araştırmalar devam etmektedir (Bargeman vd., 2002).

Peptit fraksiyonlamanın; kolon özellikleri, mobil faz ve peptit özellikleri (yük, polarite, hidrofobiklik ve boyut) olmak üzere üç bileşeni bulunmaktadır (Manadas vd., 2014). Fraksiyonlama tekniklerinin çok çeşitli olması, belirli bir numuneye en uygun olan tekniği seçmeyi zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, tüm ayırma yöntemleri her numune ve araştırma konusu için aynı derecede uygun değildir (Mostovenko vd., 2013). Belirli bir fiziksel veya kimyasal özellik temelinde kullanılacak fraksiyonlama yöntemi; yoğunluk özelliğine göre ultrasantrifüjleme, moleküler boyut özelliğine göre boyutsal ayırma kromatografisi veya jel elektroforezi, izoelektrik noktalarına göre izoelektrik odaklanma, hidrofobikliklerine göre hidrofobik etkileşim kromatografisi veya ters faz kromatografisi, taşıdıkları net yüklere göre iyon değişimi kromatografisi, spesifik biyomoleküler etkileşimlere göre afinite kromatografisi gibi fraksiyon metotları kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri veya birkaç tanesi, protein ya da peptitin sahip olduğu özellikler kapsamında, kombine bir şekilde kullanılarak saflaştırma işlemi yapılabilmektedir. Numunenin özelliklerine ve miktarına göre uygun yöntemler seçilmelidir (Issaq vd., 2002).

Eczacılık ve gıda sanayinde saflaştırılmış protein ve peptitlerin kullanım alanı oldukça fazladır. Hormonlar (insülin vd.), antikorlar, viral antijenler (hepatit B antijeni), büyüme faktörleri (interferonlar vb.), bebek mamaları gibi fonksiyonel ürünlerde bu yöntemlerden faydalanılmaktadır (Wrolstad vd., 2005).

Çörek otu protein izolatlarının fraksiyonlanması, iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İyon değişim kromatografisi, numunenin taşıdığı net yüke göre fraksiyonlamaktadır. Kolonlar, negatif (katyon değiştirici) veya pozitif (anyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurularak hidrolizat karışımı düşük iyonik güçte olan bir tamponla kolon boyunca taşınmaktadır. Burada

dikkat edilmesi gereken nokta; kullanılan tamponun pH değerinin hedef peptitin reçineye bağlanmasını sağlayacak değerde olması gerektiğidir. Eğer tamponun pH değeri peptitin izoelektrik noktasından düşük olursa protein pozitif yüklü olur ve peptit bir kation değiştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Eğer tamponun pH değeri peptitin izoelektrik noktasından yüksek olursa protein negatif yüklü olur ve peptit bir anyon değiştirici ile bağlanır. Kolondan ilk çıkan peptitler ise bağlanmayanlardır. İyonik gücü veya pH'ı farklı olan bir tampon kolondan geçirilip bağlı olan peptitlerin yükü değiştirilerek kolondan ayrılması sağlanmaktadır. İyon değişim kromatografisi, elde edilen fraksiyon çeşitliliği açısından yüksek kapasiteye sahip olduğu için tercih edilmektedir (Whitford, 2005). Bununla beraber birden fazla yöntem ve teknoloji kombine bir şekilde de kullanılmaktadır (Issaq vd., 2002).

İyon değişim kromatografisi kullanılarak; gökkuşağı alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) Calpain ve Calpastatin proteinlerinin, Japon gümüş balığından (*Hypomesus nipponensis*) antifriz protein, kaya balığından (*Sebastes schlegeli*) antibakteriyel protein elde edildiği belirtilmiştir (Kitani vd., 2007).

Nigella sativa proteinlerinin iyon değişim kromatografisi kullanılarak elde edilen fraksiyonlarında, immünomodülatör etkili fraksiyonlar elde edilmiştir (Haq vd., 1999). Daha önce elde edilen bulgulara ve çalışmamızda çörek otu hidrolizatlarında gözlemlenmiş olduğumuz antioksidatif ve biyoaktif özelliklere dayanarak iyon değişim kromatografisi ile peptitler fraksiyonlanmıştır. Etkin olan peptitlerin tanımlanması ve fonksiyonel bir bileşen olarak gıda, eczacılık gibi sektörlerde kullanım olanaklarının araştırılması amaçlanmaktadır.

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Soğuk presle yağı alınmış çörek otu posaları, İstanbul'da soğuk pres yağlar üreten yerel bir firma olan Oneva (Oneva Gıda Ltd., İstanbul, Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Soğuk presle elde edilmiş posaların tüm işlemlerinde uygulanmış maksimum sıcaklık < 40 °C'dir. Çalışma boyunca çözücü ve tampon çözelti olarak 50 mM (pH 7) potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'ten sağlanmıştır. Hiçbir zararlı, zehirli, toksik ve organik çözücü kullanılmamıştır.

2.2. Örnek Hazırlama

Aşağıdaki iş akış şemasında yağı alınmış çörek otu posalarından protein konsantresi eldesi ve bu konsantrelerden enzimatik hidroliz yoluyla gerçekleştirilen hidroliz özetlenmiştir.

2.2.1. Soğuk Preslenmiş Çörek Otu Posalarından Protein Ekstraksiyonu

Şekil 2.1'de gösterilen soğuk pres yöntemiyle yağı alınmış çörek otu posalarından alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) tekniği kullanılarak protein konsantreleri elde edildi (Karaca, Low ve Nickerson, 2011). Yağı alınmış posalar blender yardımıyla daha küçük parçalar haline getirildi (Şekil 2.2). Toz hale gelen posa su ile karıştırılarak (kütlece 1:15; numune:su) Şekil 2.3'te görülen dispersiyon hazırlandı. Proteinlerin çözünmesini sağlamak amacıyla dispersiyonun oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı (140 G, 1 saat) ve 1 N NaOH kullanılarak pH değerinin 9,5'te sabitlenmesi sağlandı. Elde edilen dispersiyon 14600xg değerinde 4°C'de 1 saat santrifüj (HITACHI, CR22N) edildi. Çözündürülmüş proteinleri içeren süpernatant toplandı ve numune tortu içerdiğinden vakum filtrasyonu işlemi gerçekleştirildi. Ardından izoelektrik çökelmenin gerçekleşmesi için 1 N HCl kullanılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla ortamın pH değeri 4,5'e getirildi. İzoelektrik çökelmenin tamamlanması için 14200xg değerinde 4 °C'de 30 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant (katı kısım/çökelti) toplandı ve liyofilizasyon işlemine kadar küçük parçalara bölünmüş bir şekilde -20 °C'de saklandı (Stone vd., 2015). Dondurulmuş numuneler bir Teknosem TRS 2/2V liyofilizatörü (Teknosem

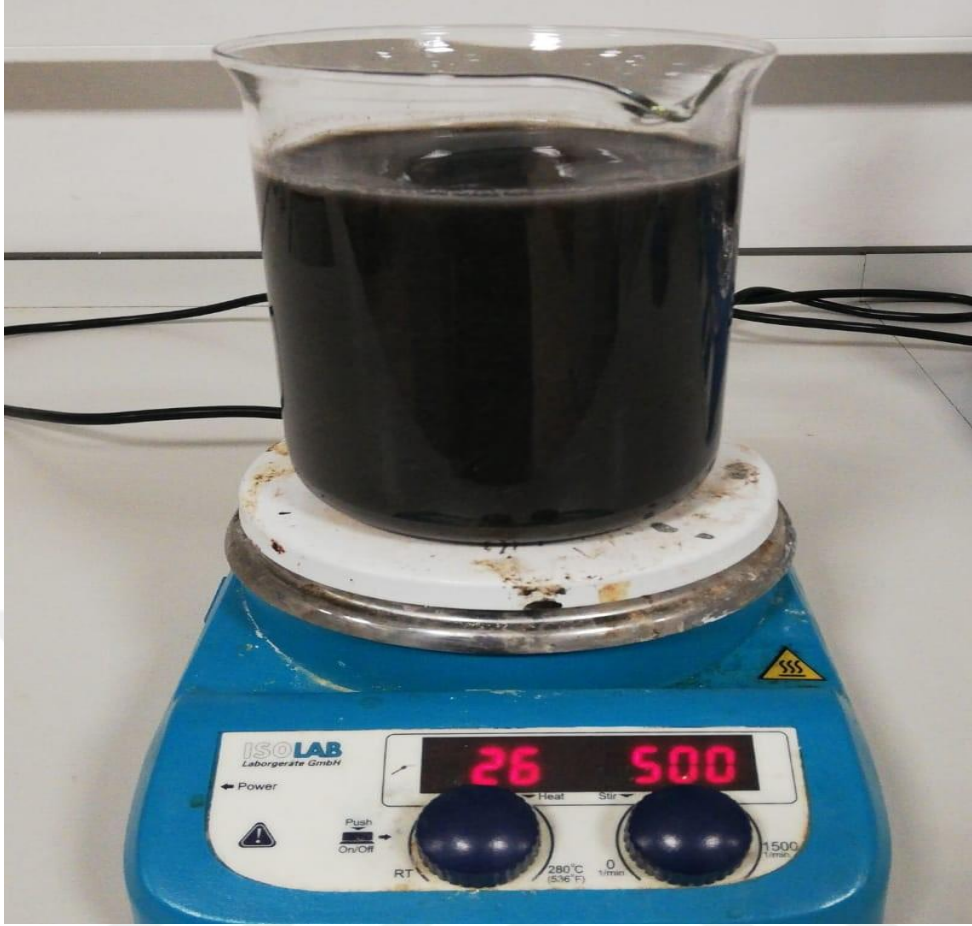
Corp., İstanbul, Turkey) kullanılarak daha konsantre hale getirildi. Şekil 2.4'te gösterilen liyofilize edilmiş numuneler proteolitik hidrolize kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 2.1: Soğuk preslenmiş çörek otu posaları.



Şekil 2.2: Blender yardımıyla küçük parçalar haline getirilen yağı alınmış çörek otu posaları.



Şekil 2.3: Yağı alınmış çörek otu posası ve su dispersiyonu (1:15 ağı/hacim).



Şekil 2.3: Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen çörek otu protein konsantreleri.

2.2.2. Kjeldahl Metodu ile Protein Miktarı Tayini

Liyofilize edilmiş çörek otu protein konsantrelerinin protein miktarı ekibimizin önceki çalışmalarında Kjeldahl protein miktar tayini yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kjeldahl metodunda; toplam organik azot miktarının belirlenebilmesi için konsantr e sülfirek asit bir katalizör yardımıyla (bakır sülfat vb.) amonyum sülfata dönüştürülür. Oluşan amonyak alkali koşullar altında borik asit çözeltisi ile damıtılır. Damıtma sonrası oluşan borat anyonları, standardize edilmiş hidroklorik asit ile titre edilerek numunedeki ham protein miktarını temsil eden azot miktarı hesaplanır. Çoğu protein % 16 oranında azot içerdiği için “6.25” olan dönüşüm faktörü ile sonuç hesaplanır (Jiang vd., 2014).

2.2.3. Çörek Otu Protein Ekstraktlarının Proteolitik Hidrolizi

Gülseren ve Corredig'in (2013) yöntemi baz alınarak, tripsin ve papain enzimleri ile proteolitik hidroliz gerçekleştirildi. Tripsin ve papain enzimleri Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Çörek otu protein konsantr esinin, 50 mM (pH 7) potasyum fosfat tamponunda 1 saat boyunca 25 °C ve 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmak suretiyle Şekil 2.5'te gösterilen sulu bir dispersiyonu (% 1) hazırlandı. Ardından dispersiyon (20160xg ve 23°C'de 10 dakika) santrifüj edildi. Sıvı kısım alınarak süpernatant tortulardan ayrıldı. Elde edilen çörek otu protein süpernatantları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

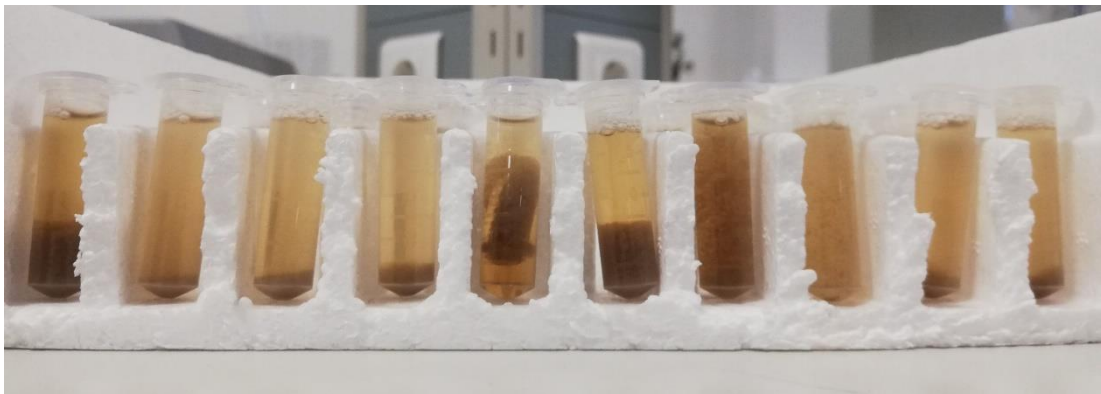


Şekil 2.4: Fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik çörek otu protein konsantr esi dispersiyonu.

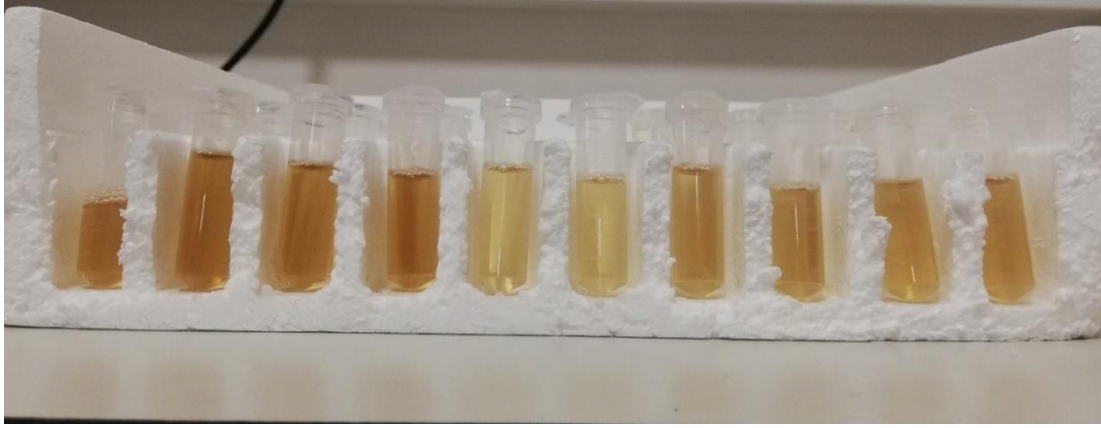


Şekil 2.5: Enzimatik hidrolize hazır çörek otu protein süpernatantları.

Her iki enzim için de 1:1000'lik enzim: protein oranında numuneler eppendorf tüplerinde hazırlandı ve termomikser (MIULAB Thermo Shaker Incubator, 37°C 1000 rpm) kullanılarak 15, 30, 60 90, 120 dakikalık sürelerle enzimatik hidroliz gerçekleştirildi. İşlem süresi tamamlanan hidrolizatların enzim aktivitelerinin durdurulması için hidrolizatlar, 95 °C'deki su banyosuna alınarak 5 dakika bu sıcaklıkta tutuldu. Ardından hidrolizatlar buz banyosu kullanılarak hızlı bir şekilde soğutuldu ve numune sıcaklığı oda sıcaklığına inince mikrosantrifüj (Neuaton, iFuge M08, 6000 RPM, 30 dakika) kullanılarak çözünmeyen parçacıklardan ayrılması sağlandı (Şekil 2.7). Aynı işlemler sadece protein çözeltisine de uygulanırken enzim+protein örneğinde termomikser aşaması atlanarak uygulandı. Son olarak tüm numuneler, 0.45 µm selüloz asetat ("cellulose acetate", CA) şırınga filtrelerden geçirilerek elde edilen Şekil 2.8'deki numuneler analiz aşamalarına kadar -80 °C'de depolandı.



Şekil 2.6: Papain ve tripsin enzimleri ile farklı sürelerde (0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilerek elde edilmiş çörek otu protein konsantresi ve hidrolizatları.



Şekil 2.7: Çörek otu protein konsantresi ve hidrolizatlarının santrifüj ve filtrasyon işlemi sonrası görüntüleri.

2.3. Biyoaktivite Testleri

Elde edilen protein ve peptitlerin, anti-Alzheimer etkilerinin incelenebilmesi için asetilkolinesteraz (AChE) önleyici aktivite testinden yararlanılmıştır (Şenol vd., 2010).

2.3.1. Asetilkolinesteraz (AChE) Önleyici Aktivitesi Testi

Çörek otu proteinlerinin tripsin ve papain enzimleri ile elde edilmiş hidrolizatlarının AChE önleyici aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla, oda sıcaklığına getirilmiş 10 µl peptit numuneleri (0, 15, 30, 60, ve 120. dakika), 150 µl sodyum fosfat tamponu (0,1 M pH 8), 1000 µl AChE enzimi (0,1 unite/ml) thermomixer yardımıyla 15 dakika boyunca 25°C’de inkübe edildi. Ardından, 10 µl DTNB çözeltisi (10 mM) ve 10 µl ATCI çözeltisi (14 mM) eklendikten sonra renkli ürün oluşumu gözlemlendi. 10 dakika sonra spektrofotometre ile 412 nm’de ölçüm gerçekleştirildi (Şenol vd., 2010).

2.3.2. Antioksidatif Aktivite Testleri

Elde edilen protein ve peptitlerin antioksidatif etkileri, farklı oksidatif mekanizmaların incelenebilmesi için 4 farklı antioksidan aktivite testinden yararlanılarak araştırılmıştır.

2.3.2.1. DPPH Tutma Aktivitesi Testi

Oda sıcaklığına getirilmiş 0,1 ml peptit numuneleri (0, 15, 30, 60, 90 ve 120.dakika), 0,1 ml DPPH çözeltisi (5,3 mg DPPH/100 ml metanol) ile karıştırıldı. Ayrıca yalnızca tampon (potasyum fosfat), tampon ile DPPH, enzim ile DPPH ve protein ile DPPH içeren numuneler de ölçüm için hazırlandı. DPPH içeren tüm örnekler ölçümden önce

15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından 515 nm'de zamana bağlı absorbans ölçümü yapıldı. Her bir örnek iki paralel olacak şekilde hazırlandı ve ölçüm yapıldı (Villano, vd., 2007).

2.3.2.2. Demir Şelatyon Aktivite Testi

Ebrahimzadeh (2009) yöntemine uygun olarak çörek otu protein ve peptidinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesi belirlenmiştir. Farklı dakikalar (0, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakika) boyunca hidroliz edilmiş peptit çözeltilerinden 0,5 ml alınarak 1,6 ml saf su ve 0,05 ml 2 mM $FeCl_2$ karıştırıldı. 30 saniye sonra karışıma 0,1 ml 5 mM ferrozin eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Oluşan Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin absorbansı 563 nm'de ölçüldü. Bilinen en güçlü demir şelatlayıcı olan ve bu nedenle numunelerin şelatlama performansını değerlendirebilmek amacıyla kullanılan EDTA ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca tampon (potasyum fosfat), enzim (tripsin ve papain) ve protein numunelerinin de tek başlarına ölçümleri yapıldı. Ölçümü yapılan her bir numuneden iki paralel hazırlanarak ölçüm yapıldı.

2.3.2.3. Hidroksil Radikali Tutma Aktivitesi Testi

0,1 ml 10 mM $FeSO_4$, 0,1 ml 10 mM EDTA, 0,5 ml 10 mM α -deoxyriboz, 0,9 ml potasyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7) ve 0,2 ml protein ya da peptit çözeltileri karıştırıldı. Bu karışıma 0,2 ml 10 mM H_2O_2 eklenip numuneler $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 saat boyunca termomikserde inkübe edildi. 1 saat sonra 1 ml % 2.8 TCA ve 1 ml % 1,0 TBA numune tüplerine katılarak kaynayan bir su banyosunda 15 dakika boyunca tutuldu. Numuneler oda sıcaklığına inince 532 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Aynı zamanda tampon çözeltinin ve enzimlerin tek başlarına ölçümleri yapıldı (Candan vd., 2003).

2.4. Peptitlerin Fraksiyonlanması

Yapılan testlerde en yüksek antioksidatif aktivitenin gözlemlendiği hidrolizat sürelerine yakın sonuçların genellikle 30 dakika hidroliz gerçekleştirilen örneklerden elde edilmesi sebebiyle fraksiyonlama işleminin 30 dakikalık tripsin ve papain hidrolizatlarına uygulanmasına karar verilmiştir.

Çörek otu protein hidrolizatlarının ayrılması, dakikada 1 ml akış ile çalışacak sistemde iyon değişim kolonları arasından anyon değişim kolon olan HiTrap 1 ml Cpto DEAE (zayıf anyonik) kolonu kullanarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlanma işleminde tuzsuz tampon olan A tamponu için Tris-HCl (20 mM, pH 8) ve tuzlu tampon olan B tamponu için Tris-HCl (20 mM, pH 8) ve NaCl (1M) tamponları kullanıldı. Bununla beraber 0-100 gradient 35 CV (column volume) ile çalışıldı. İyon değişim kromatografisi yöntemi ile UV ve iletkenlik dedektörleri kullanılarak otomatik örnekleme ile anyonik fraksiyonlar toplanırken katyonikler atık olarak toplandı (Sheih, Fang ve Wu, 2009).

Papain ile 30 dakika hidroliz edilen çörek otu protein ekstraktlarının daha güçlü sinyal vermesi nedeniyle antioksidatif bir analiz olan DPPH tutma aktivitesi ve LC-Q-TOF/MS analizlerinin bu fraksiyonlara uygulanmasına karar verilmiştir.

2.4.1. Fraksiyonlanmış Peptitlerin DPPH Tutma Aktivitesi Testi

Çörek otu protein konsantrelerinin papain enzimi ile 30 dakika hidroliziyle elde edilmiş peptitlerin fraksiyonlanması sonucu 4 ayrı fraksiyon elde edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilmiş 0.1 ml fraksiyonlanmış peptit numuneleri (PA, PB, PC, PD), 0.1 ml DPPH çözeltisi (5.3 mg DPPH/100 ml metanol) ile karıştırıldı. Ayrıca yalnızca tampon (potasyum fosfat), tampon ile DPPH, enzim ile DPPH ve protein ile DPPH içeren numuneler de ölçüm için hazırlandı. DPPH içeren tüm örnekler ölçümden önce 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından 515 nm'de zamana bağlı absorbans ölçümü yapıldı. Her bir örnek iki paralel olacak şekilde hazırlandı ve ölçüm yapıldı (Villano vd., 2007).

2.4.2. Fraksiyonlanmış Peptitlerin LC-Q-TOF/MS Analizi

Papain enzimi ile hidroliz edilmiş 4 adet çörek otu protein konsantresi fraksiyonu, 10 mM DTT ile 55 °C'de 10 dakika inkübe edilerek hidrolizatlar redükte edildi. Hidrolizat karışımları oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 mM Iodoacetamide (IAA) ile alkile edildi ve örnekler 30 kDa filtrelerden geçirildi. Ardından hidrolizat örneklerine peptit konsantrasyon tayini yapıldı ve örnekler enjeksiyon başına 1 ug olacak şekilde LC-Q-TOF/MS analizi için viallere alındı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS QToF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları

gerçekleştirildi. Metot SONAR ve sensitivite moduna getirilerek oluşturulan triptik peptitler, hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlandı. Asetonitril % 5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0.7 sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptitin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0.7 sn kadar MS/MS analizi yapıp peptitin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı. ProteinLynx Global Server (PLGS 3.0) yazılımı kullanarak peptit ve protein tanımlamaları yapıldı. Protein tanımlamaları yapılırken her bir örnek için uygun protein databankları kullanıldı.

2.4.3. Fraksiyonlanmış Peptitlerin *In Silico* Analizleri

Uygun tekniklerle dizilimleri belirlenen peptitlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.

Öncelikle peptitlerin izoelektrik noktası ve toksisite parametreleri Gupta vd. (2013) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir. Peptit dizilimlerinin biyoaktif olma ihtimali, biyoaktivite çeşidinden bağımsız olarak Mooney vd. (2012) çalışmasına uygun olarak hesap edilmiştir ve PeptideRanker skoru olarak raporlanmıştır. Aktif fraksiyonların ilgili aktiviteyi spesifik olarak ortaya çıkarma potansiyeli ve ilgili inhibisyon parametreleri Minkiewicz vd. (2008) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.

Son olarak, biyoaktivitenin gözlemlendiği ve *in silico* bulgularla bu gözlemlerin desteklendiği durumlarda, ilgili peptitlerin ve inhibe ettikleri enzimlerin arasındaki etkileşimler Trabuco vd. (2012) tarafından öngörüldüğü biçimde belirlenmiş ve ilgili çizimler hazırlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında soğuk preslenmiş çörek otu yan ürünlerinden; protein konsantreleri ve bu protein konsantrelerinin papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde (0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilmesiyle çörek otu protein hidrolizatları elde edilmiştir. Ekibimizin önceki çalışmalarında yağı alınmış çörek otu posalarından alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme yöntemi ile elde edilmiş protein konsantrelerinin protein miktarı Kjeldahl analizi ile 54.7 ± 0.5 olarak belirlenmiştir (Çakır ve Güseren, 2019). Elde edilen konsantre ve hidrolizatlara çeşitli anti-oksidatif testler (DPPH inhibisyonu, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi) ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibe edici anti-Alzheimer biyoaktif testi uygulanarak protein konsantrelerinin ve hidrolizatların özellikleri araştırılmıştır. Papain ve tripsin enzimi olmak üzere iki ayrı enzim kullanılarak farklı sürelerde bu enzimlerin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatların antioksidatif ve biyoaktif özellikleri belirlenmiştir. Papain ve tripsin enzimleri ile farklı sürelerde gerçekleştirilen muamele sonucu elde edilen hidrolizatlara ait sonuçlar Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Test	Hidroliz Süresi (dak.)	Sonuç (%)
AChE önleyici aktivite	30	25.63 ± 0.6
DPPH tutma aktivitesi	120	59.80 ± 2.6
Demir şelasyon aktivitesi	90	59.23 ± 5.5
Hidroksil radikali tutma aktivitesi	15	60.51 ± 2.0

Tablo 3.1: Farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dak.) papain ve tripsin enzimleri ile elde edilen hidrolizatlardan, antioksidatif testler ve Asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon testinde elde edilen en yüksek sonuçlar.

Yapılan testler sonucu en yüksek aktivitenin görüldüğü hidrolizat örneği (papain enzimi ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein konsantresi) fraksiyonlanarak dört ayrı fraksiyon elde edilmiştir (PA, PB, PC, PD). Elde edilen bu fraksiyonlara tekrar DPPH tutma aktivitesi testi uygulanarak anti-oksidatif özelliği değerlendirilmiştir. Bununla beraber, LC MS/MS analizi ile fraksiyonlanmış dört adet protein hidrolizatlarının (PA, PB, PC ve PD) peptit yapıları aydınlatılmıştır.

Bu tez kapsamında; bitkisel kaynaklı ve yan ürün niteliğinde olan, yağı alınmış çörek otu protein konsantrelerinin ve hidrolizatlarının antioksidatif ve biyoaktif özelliklerinin aydınlatılması üzerine çalışılmıştır. Aynı zamanda çörek otu proteinlerinin yapısında bulunan değerli bileşenlerin varlığının araştırılması, bitkisel kaynaklı antioksidatif ya da biyoaktif protein veya peptitlerin eldesinde bu atığın değerlendirilmesine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

3.1. Biyoaktivite Testleri

Elde edilen protein ve peptitlerin, anti-Alzheimer etkilerinin incelenmesi için yapılan asetilkolinesteraz (AChE) önleyici aktivite testinin sonuçları aşağıda tartışılmıştır.

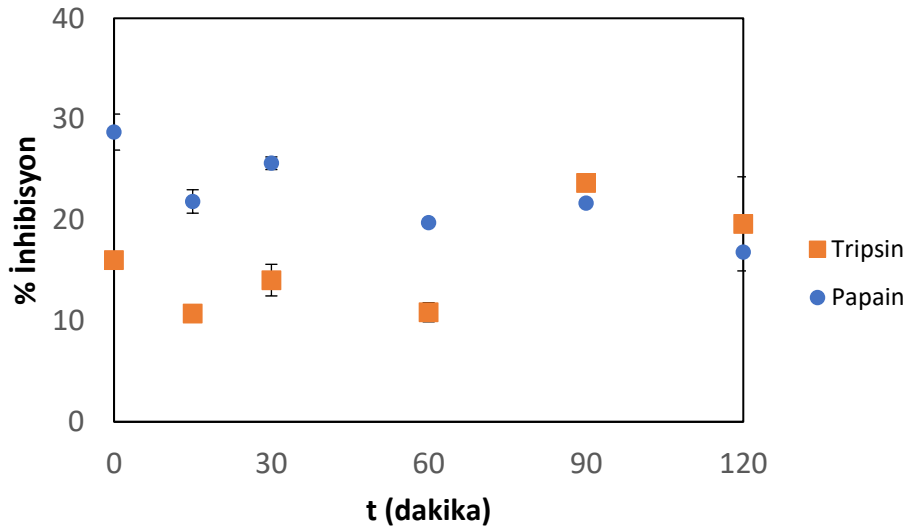
3.1.1. AChE Önleyici Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz (AChE), bir nörotransmitter olan asetilkolini (ACh) asetik asit ve koline katalizleyen bir enzimdir (Koçancı ve Aslım, 2016). Alzheimer hastalığının gözlendiği beyin dokularının incelenmesi sonucu; AChE'nin etkinliğinin arttığı ve buna bağlı olarak sinir iletimini sağlayan AChE'nin miktar ve aktivasyonunun düştüğü belirlenmiştir. Sinir iletiminin kesintiye uğraması da bilişsel eksiklik ve davranışsal anormallikler ile karakterize nörolojik bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH) ile sonuçlanmaktadır (Şenol vd., 2010). Bu nedenle AChE'yi kolin ve asetik aside hidrolizleyen kilit enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu, AH'ye karşı en yaygın kullanılan tedavi seçeneklerinden biri haline gelmiştir (Orhan, Orhan ve Şener, 2006). Karaciğerden salgılanan ve bir diğer kolinesteraz olan bütirilkolinesteraz (BChE) bütirilkolini katalizlemektedir. Bütirilkolinesterazın da kolin bileşiklerinin varlığını azaltmasından dolayı Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle BChE ile yapılan anti-Alzheimer çalışmaları da bulunmaktadır (Beach, 2000).

AH'nin tedavisinde kullanılan Amerikan İlaç Dairesi), ("Food and Drug Administration", FDA) onaylı asetilkolinesteraz inhibitörlerinden Rivastigmin (*Physostigma venenosum* Balf.) ve Galantamin (*Amaryllidaceae* alkaloidi) bitkisel kaynaklı, Takrinin ve Donepezil ise sentetik kaynaklı ilaçlardır. Bunlarla beraber zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen kurkuminin de Alzheimer hastalığını önlediğine dair yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir (Konakçı ve Aslım, 2016).

Çalışmamızda çörek otu protein konsantreleri ve papain ve tripsin enzimleriyle farklı süreler (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) boyunca muamele edilmiş hidrolizatlarla çörek otunun AChE önleyici aktivitesi araştırılmıştır ve sonuçlar Şekil 3.1’de verilmiştir.

Öncelikle, çörek otu protein konsantrelerinin hidroliz edilmeden önce ($t=0$) AChE önleyici aktiviteleri ($\% 28.72 \pm 1.78$ ve $\% 16.03 \pm 0.08$) gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle papain ile hidrolize edilmiş örneklerde hidrolize edilmemiş örneklere göre aktivitenin düştüğü, en yüksek aktivitenin $\% 28.72 \pm 1.78$ ile hidroliz edilmemiş ($t=0$) çörek otu protein konsantresine ait olduğu görülmektedir. Tripsin ile hidroliz edilmiş örneklerde, hidroliz edilmemiş protein konsantrelerine göre inhibisyonun daha düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, 90. ve 120.dakikalarda sırasıyla $\% 23.68 \pm 0.66$ ve $\% 19.62 \pm 4.66$ oranlarıyla protein konsantresine göre daha yüksek oranda inhibisyon değerleri elde edilmiştir.



Şekil 3.1: Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri AChE önleyici aktiviteleri.

Enzim aktivitelerini kendi aralarında kıyaslamak gerekirse; hidroliz edilmemiş konsantrelere göre papain hidrolizinin inhibisyonu düşürmüş olmasına rağmen tripsin ile hidroliz edilen örneklere göre daha yüksek inhibe edici etki gösterdiği söylenebilir. Bu durumda papain ile elde edilen hidrolizatların daha fazla muhtemel anti-Alzheimer etkisi gösteren hidrolizatlar olduğunu söylemek mümkündür. Bununla beraber hidroliz işlemi uygulamadan ($t=0$) en yüksek inhibisyon aktivitesinin görülmesi, çörek otu proteininin *in vitro* olarak doğrudan anti-Alzheimer etkiye sahip olduğunu

göstermektedir. Zaman ve enerji tasarrufu yönünden incelendiğinde de hidroliz işlemi olmadan istenen etkinin görülebilmesi oldukça önemlidir. Buna ek olarak, mevcut protein üretim tekniği de endüstriyel koşullara adapte edilmeye uygundur. *In vitro* olarak, hidroliz işlemi yapmaksızın çörek otu proteinlerinin biyoaktif etkiler gösterme potansiyeli taşıdığı anlaşılmaktadır.

Günümüzde, Alzheimer hastalığında kullanılan AChEi ilaçlar kesin başarı sağlayamadığından bu hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici potansiyele sahip yeni AChE inhibitörlerinin araştırılmasına yönelik çalışmaların oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (Konakçı ve Aslım, 2016). Bu nedenle soğuk pres yağ sanayinin bir yan ürünü olan çörek otu posasından elde edilecek biyoaktif peptit ve proteinler önem kazanmaktadır. Bu bileşenlerin gıda, kozmetik ve eczacılık ürünlerinde kullanım potansiyeli, tüketimi nispeten zor bir ürün olan çörek otunun da kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

3.1.2. Antioksidatif Aktivite Testleri

İnsan sağlığı açısından, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve birçok hastalığın görülme sıklığının azaltılmasında çeşitli kaynaklardan elde edilen antioksidanlar önemli bir rol oynamaktadır (Oroian ve Escriche, 2015). Bununla beraber gıda ürünlerinde gerçekleşen lipid oksidasyonunun inhibe edilmesinde protein ve peptitlerin etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Süt proteini, soya proteini, buğday proteini, pirinç proteini ve mısır proteini antioksidatif etkiler gösteren çeşitli kaynaklardandır (Singh, 2011).

Serbest radikallerin çok çeşitli olması ve çörek otu proteinlerinin bu serbest radikallerden hangilerine karşı anti-oksidatif etki gösterme potansiyeline sahip olduğunun belirlenmesi amacıyla birden fazla anti-oksidatif test uygulanması uygun görülmüştür.

Çörek otu protein ekstraktlarının papain ve tripsin enzimleriyle farklı süreler boyunca (0, 15, 30, 60, 90, 120 dakika) hidroliz edilmiş örneklerle uygulanan; DPPH, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi testleri sonuçları ile beraber tartışılmıştır.

3.1.2.1. DPPH Tutma Aktivitesi Testi

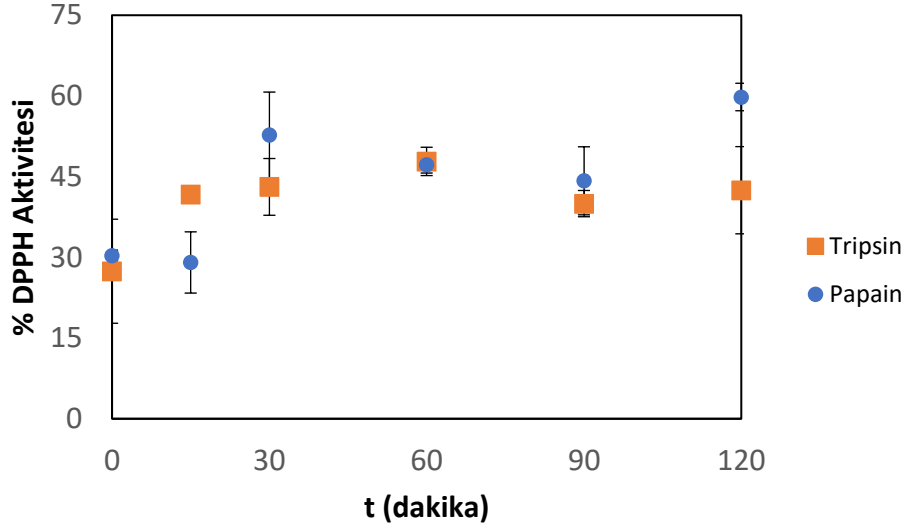
DPPH radikali; antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan ilk sentetik radikaldir (Frankel ve Meyer, 2000). Etanol içindeki çözeltisi mor renkli olan DPPH radikali, antioksidan tarafından indirgendikçe rengi açılmaya başlar. Antioksidan konsantrasyonu ve renk açılması arasında doğrusal bir ilişki olan bu analizde reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre kullanılarak absorbans ölçümü ile gerçekleştirilmektedir (Frankel ve Meyer, 2000). Antioksidan aktivitesinin bulunmadığı ortamlarda renk değişikliği olmadığı için absorbans değerlerinde değişkenlik gözlenmemektedir.

Singh (2011) tarafından proteinlerin, protein hidrolizatlarının ve fraksiyonlarının serbest radikalleri temizleme etkisinin ölçüldüğü yöntemlerden biri olarak belirtilen DPPH tutma aktivitesi testi, çalışmamızda kullanılmıştır. Bu çalışmada; hidroliz edilmemiş protein ekstraktı ve farklı süreler (15, 30, 60, 90, 120 dak.) boyunca papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz edilmiş konsantrelerin DPPH tutma aktivitesi testi ile antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2’de verilmiştir.

Papain enzimi kullanılarak hidroliz edilmiş çörek otu protein konsantrelerinde; hidroliz edilmemiş protein konsantresinin (0.dak.) DPPH radikalini inhibe etme aktivitesi % 30.35 ± 0.1 olarak bulunurken 15.dakika da bu aktivitede biraz azalma gözlenmiştir. 30. dakikada aktivite, 0. dakikaya göre artarken 60 ve 90. dakikalarda 30.dakikaya göre azalma görülmüştür. En yüksek aktivite ise % 59.80 ± 2.6 ile 120 dakika hidroliz edilmiş konsantreden elde edilmiştir. 30 dakika hidroliz edilmiş konsantrenin % 52.76 ± 8 ile 120 dakika hidroliz edilmiş konsantrenin aktivitesine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak papain enzimi ile hidroliz sonucu; zaman ve enerjiden tasarruf etmek amacıyla 120 dakika yerine 30 dakika hidroliz ile çörek otu protein konsantresi hidrolizatlarından en etkili sonuçların alınabileceği söylenebilir.

Tripsin enzimi kullanılarak hidroliz edilmemiş protein konsantresinden (0.dak.) alınan % 27.42 ± 9.7 sonucu ve tripsin enzimi ile 15 dakika hidroliz edilmiş konsantreden % 41.71 ± 0.4 sonucunun alınması, hidroliz işleminin DPPH radikali giderme etkisini arttırdığını göstermektedir. 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika hidroliz edilmiş konsantrelerde sonuçların birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. DPPH radikalini giderme aktivitesinin 60 dakika hidroliz edilmiş protein konsantrelerinde %

47.83 ± 2.7 ile en yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. Hidroliz süresinin 60.dakikadan itibaren uzatılmasının ise 90.dakikada % 39.99 ± 2.5 ve 120. dakikada % 42.47 ± 8.1 sonuçlarının elde edilmesiyle antioksidatif etkiyi düşürdüğünü göstermektedir.



Şekil 3.2: Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri DPPH inhibisyonu.

Her iki enzimi birbiri ile kıyaslamak gerekirse; 15 dakikalık bir hidroliz ile tripsin enziminin en iyi sonucuna yaklaşılrken, papain enziminde 15 dakikalık hidroliz sonucu hidroliz edilmemiş konsantreye göre bir miktar düşüş gözlenmiştir. Papain enziminde görülen en yüksek serbest radikal giderme değerine ise 30 dakikalık hidroliz sonucu yaklaşıldığı görülmüştür. Papain enzimi ile hidrolizde süresinin uzatılmasıyla aktivitenin de artabileceğini fakat tripsin enziminde sürenin çok kritik bir gelişmeyi açığa çıkarmadığını söylemek mümkündür. Her iki enzimin aynı süre içindeki sonuçlarında benzerlik olmakla beraber 120. dakikada papain enziminin etkisi % 59.80 ± 2.6 ile diğer sonuçlara göre daha yüksektir.

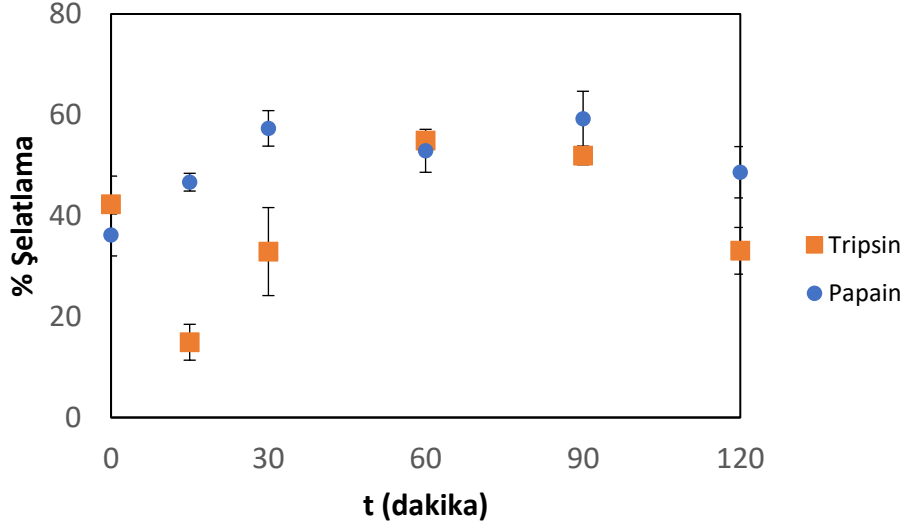
Sentetik bir radikal olan DPPH radikali kullanılarak çörek otu protein konsantresi ve farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz edilmiş konsantrelerden elde edilen sonuçlara göre; çörek otu protein konsantrelerinin ve hidroliz edilmiş konsantrelerinin DPPH radikalini giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

3.1.2.2. Demir Şelasyon Aktivite Testi

Demir şelasyon aktivitesi testi; güçlü bir demir bağlayıcı reaktif olan ferrozin ve analiz edilmek istenen örneğin (çalışmamızda çörek otu protein konsantreleri ve bunların hidrolizatları) Fe^{2+} iyonlarının olduğu ortamda birlikte bulunarak, iyonları bağlama yarışını göstermektedir (Dinis, Madeira ve Almeida, 1994). Fe^{2+} /ferrozin kompleksi güçlü kırmızı renk vermektedir ve bu kompleksin oluşması engellendikçe kırmızı renk oluşumu azalmaktadır. Dolayısıyla analiz spektrofotometrik bir ölçüme dayanmaktadır (Dinis, Madeira ve Almeida, 1994). Demir şelatörlerinin hücre içine girmesiyle serbest demiri bağlayarak etkisizleştirmeleri, hidroksil radikalının oluşmasını engelleme açısından oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çörek otu protein konsantrelerinin ve papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde (15, 30, 60, 90, 120 dakika) elde edilen hidrolizatlarının demir şelatlama aktivitesinin sonuçları Şekil 3.3'te verilmiştir. Papain ile hidroliz edilmemiş protein konsantrisinin (0. dakika) % 36.19 ± 4.2 sonucu, farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen sonuçlara göre daha düşüktür. Demir şelasyon aktivitesi 15. ve 30. dakikalarda artış gösterirken 60. dakikada 30.dakikanın altına düşmüştür. Papain hidrolizatlarında, % 57.33 ± 3.5 ile 30.dakikada ve % 59.23 ± 5.5 ile 90. dakikada en yüksek değerler gözlenmiştir. Hidrolizin 120.dakikaya kadar devam etmesi ise aktiviteyi % 48.63 ± 5.1 'e düşürmüştür. Bu sonuçlara dayanarak hem en yüksek aktivitenin görülmesi hem de enerji ve zaman tasarrufu dikkate alındığında papain örneklerinde şelatlama aktivitesi için en uygun hidrolizatların % 57.33 ± 3.5 ile 30 dakikalık çörek otu protein hidrolizatlarından elde edildiği söylenebilir.

Tripsin ile hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantrinden alınan % 42.27 ± 5.6 sonucu, 15 ve 30 dakika süreli hidrolizin şelasyon aktivitesini sırasıyla % 14.93 ± 0.0 ve % 32.90 ± 8.7 'ye düşürdüğünü göstermektedir. Hidroliz süresinin artmasıyla; 60.dakikada % 54.91 ± 1.5 ve 90. dakikada % 51.94 ± 1.8 sonuçları elde edilmiştir. Bununla beraber hidroliz süresinin daha fazla uzatılması (120 dakika) ise şelatlama aktivitesinin % 33.05 ± 4.6 ile tekrar hidroliz edilmemiş örneğe göre daha düşük sonuç vermesine neden olmuştur. Tripsin enziminde en yüksek aktivite % 54.91 ± 1.5 ile 60. dakikada elde edilmiştir.



Şekil 3.3: Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri demir şelasyon aktiviteleri.

Çörek otu protein konsantrelerinin enzimatik hidroliz muamelesinden önce de ($t=0$) demir şelasyon aktivitesi gösterdikleri görülmektedir (Şekil 3.3). Bununla beraber tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizin demir şelasyonu üzerinde çok belirgin bir etkiye yol açtığı görülmemektedir. Papain ve tripsin enzimlerini kıyaslamak gerekirse; protein papain ile hidroliz edilmesi, hidroliz edilmeyen konsantrelere göre aktiviteyi arttırmıştır. Tripsin ile kısa süreli (15 dakika) hidroliz sonucunda ise aktivite oldukça düşmüştür. Çörek otu protein konsantrelerinin demir şelatlama potansiyeli olmakla beraber; bu aktivitenin, nispeten daha kısa sürede ve enerjiden tasarruf sağlayarak daha etkin biçimde elde edilmesi için papain enziminin tercih edilmesi daha anlamlı görünmektedir.

Bilinen en güçlü demir şelatlayıcılardan biri olduğu için çalışmamızda pozitif kontrol olarak EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) bileşiği kullanılmıştır (Song vd., 2014). EDTA ile gerçekleştirilen demir şelasyon aktivitesi testinde $\% 89.03 \pm 4.1$ şelasyon aktivitesi elde edilmiştir. Papain ile 30 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen örnekte $\% 57.33 \pm 3.5$ ve 60 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen örnekte $\% 59.23 \pm 5.5$ şelasyon aktivitesi gözlenmiştir. Tripsin ile 60 dakikalık hidroliz sonucunda ise $\% 54.91 \pm 1.5$ şelasyon aktivitesi elde edilmiştir. Hidroliz uygulanmamış çörek otu protein konsantrisinin ise $\% 42.27 \pm 5.6$ oranında şelasyon aktivitesi bulgulanmıştır.

Bu sonuçlar çörek otu protein ve hidrolizatlarının demiri şelatlama potansiyeline sahip doğal birer kaynak olduklarını göstermektedir.

3.1.2.3. Hidroksil Radikali Tutma Aktivitesi Testi

Hidrojen peroksidin geçiş metalleriyle indirgenmesi sonucu oluşan (Fenton reaksiyonu) hidroksil radikali (OH[•]), yüksek reaktivitesine (9-10 sn) bağlı olarak en fazla toksisiteye sahip olan serbest radikaldir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Organik asitler, amino asitler, fosfolipitler ve nükleik asitler gibi birçok biyokimyasal madde ile reaksiyona girebilmektedir. Oldukça reaktif olması ve yarılanma ömrünün kısıtlılığı nedeniyle bulunduğu yerde büyük hasarlar yaratabilmekte ve yeni radikallerin oluşumuna sebebiyet verebilmektedir (Becker, Nissen ve Skibsted, 2004).

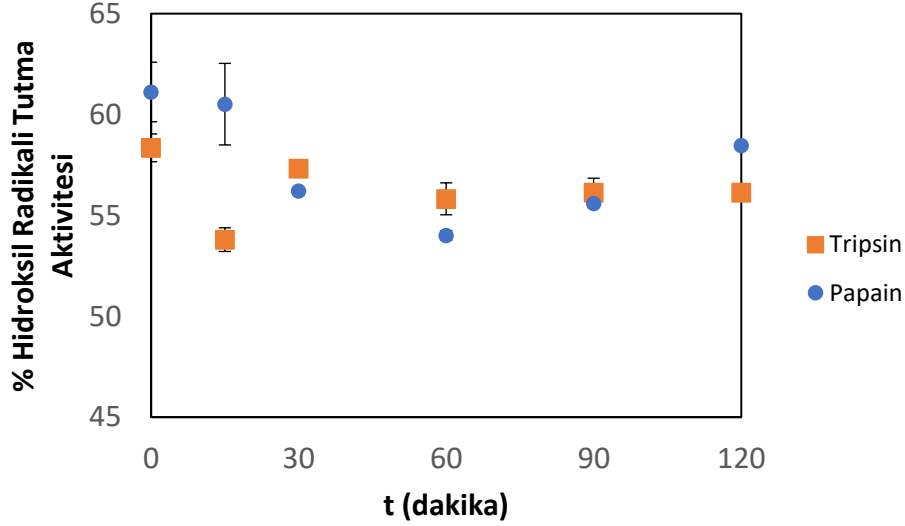
Hidroksil radikali tutma aktivitesi testinde hidroksil radikali *in vitro* koşullarda, Fe²⁺ ve H₂O₂'nin reaksiyonu sonucu üretilerek test edilen numunenin hidroksil radikalini tutma aktivitesi ölçülmektedir. Antioksidan aktivite gösteren numune aynı zamanda Fe²⁺ iyonunu şelatlama etkisi de göstererek dolaylı olarak hidroksil radikali oluşumunu engelleyebilmektedir. Bu nedenle test edilen numunenin iyi bir şelasyon ya da hidroksil radikali tutma etkisi tam olarak birbirinden ayırt edilememektedir (Becker, Nissen ve Skibsted, 2004).

Çalışmamızda çörek otu protein ve papain ve tripsin enzimleriyle muamelesinde farklı süreler boyunca (15, 30, 60, 90 ve 120 dakika) hidroliz edilmiş örneklerin hidroksil radikalini tutma aktiviteleri ölçülerek sonuçlar Şekil 3.4'te verilmiştir.

Hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinin (t=0) % 61.12 ± 1.5 oranında hidroksil radikali tutma aktivitesi gözlenmiştir. Papain ile gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen konsantrelerde 90. dakikadan önce hidroksil radikali tutma aktivitesinde düşüş yaşandığı, 90. ve 120.dakikalarda ise diğer sürelerle göre artış yaşandığı görülmektedir. Hidrolizatlar arasında en yüksek aktivitenin % 60.51 ± 2 ile 15. dakikada elde edilen hidrolizattan alındığı bulgulanmıştır. Bununla beraber papain ile hidroliz edilmemiş protein konsantresinin tüm hidrolizatlardan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Tripsin enzimi ile hidroliz edilmemiş protein konsantresinin hidroksil radikali tutma aktivitesi % 58.35 ± 0.6 oranı ile hidrolizatların aktivitelerinden daha yüksek sonuç vermiştir. Tripsin enzimi hidrolizatlarının hidroksil radikali tutma aktivitelerinin

birbirine yakın değerlerde olduğunu söylemek mümkündür. Tripsin enzimi kullanılarak elde edilen hidrolizatlarda en yüksek aktivite % 57.32 ± 0.3 sonucu ile 30 dakika hidroliz edilmiş konsantrede grlmştir. En düşük aktivite ise % 53.80 ± 0.6 ile 15 dakika hidroliz edilmiş protein konsantresinden elde edilmiştir. Bununla beraber tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizatlarda da aktivitenin, hidroliz edilmemiş protein konsantrelerine göre düşmüş olduğu görülmektedir.



şekil 3.4: Papain ve tripsin enzimleriyle hidroliz uygulanmamış (0. dakika) ve uygulanmış (15, 30, 60, 90, 120. dakika) protein örneklerinin, hidroliz edilme sürelerine göre gösterdikleri hidroksil radikali tutma aktiviteleri.

Papain ve tripsin enzimleri kullanılarak farklı sürelerde hidroliz edilmiş örneklerin hidroksil radikali giderme aktiviteleri birbirleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Bununla beraber her iki enzim de aktiviteyi dşrmştir. Çörek otu protein ekstraktından, hidroliz örneklerine göre daha yüksek aktivite değerleri alınması hidroliz olmaksızın çörek otu proteinlerinin hidroksil radikali giderme aktivitesini göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak; enzimatik hidroliz gerekleştirmeksizin zaman ve enerji tasarrufu sağlayarak çörek otu proteinlerinin oldukça reaktif olan hidroksil radikalini giderme potansiyelinin değerlendirilebileceği söylenebilir.

Antioksidatif zelliklerinin araştırılması amacıyla DPPH inhibisyonu, demir şelasyon aktivitesi ve hidroksil radikali tutma aktivitesi testleri uygulanan çörek otu protein konsantreleri ve farklı sürelerde (15, 30, 60, 90 ve 120) papain ve tripsin ile gerçekleştirilen hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatlarının antioksidatif aktiviteleri

değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda tüm testlerde hem çörek otu protein konsantrelerinin hem de hidrolizatlarının antioksidatif aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. DPPH testinde en yüksek aktivite % 59.80 ± 2.6 oranı ile 120 dakikalık papain hidrolizatına aitken; demir şelasyon testinde en yüksek aktivite % 59.23 ± 5.5 ile 90 dakikalık papain hidrolizatına; hidroksil radikali tutma aktivitesi testinde en yüksek aktivite ise hidroliz edilmemiş protein konsantresinden (% 61.12 ± 1.48) sonra % 60.51 ± 2.02 oranı ile 15 dakikalık papain hidrolizatına aittir.

Yapılan tüm anti-oksidatif aktivite testlerini değerlendirmek gerekirse en yüksek anti-oksidatif aktivite % 61.12 ± 1.48 oranı ile hidroliz edilmemiş çörek otu protein konsantresinin hidroksil radikali tutma aktivitesine aittir. Papain enziminin tüm testlerde en yüksek aktivitesine 30 dakikalık hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatlar ile yaklaştığını ve bu nedenle bu sürede elde edilen hidrolizatların fraksiyonlanmasına karar verildiğini söylemek mümkündür. Fraksiyonlama ile daha yüksek oranda anti-oksidatif etki gösterecek hidrolizatların elde edilmesi ve bu hidrolizatların LC-Q-TOF/MS analizi ile peptit yapılarının detaylandırılması amaçlanmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalarla, anti-oksidatif etki görülen çörek otu protein konsantrelerinde biyoaktif peptit varlığı araştırılmaktadır.

3.2. Peptitlerin Fraksiyonlanması

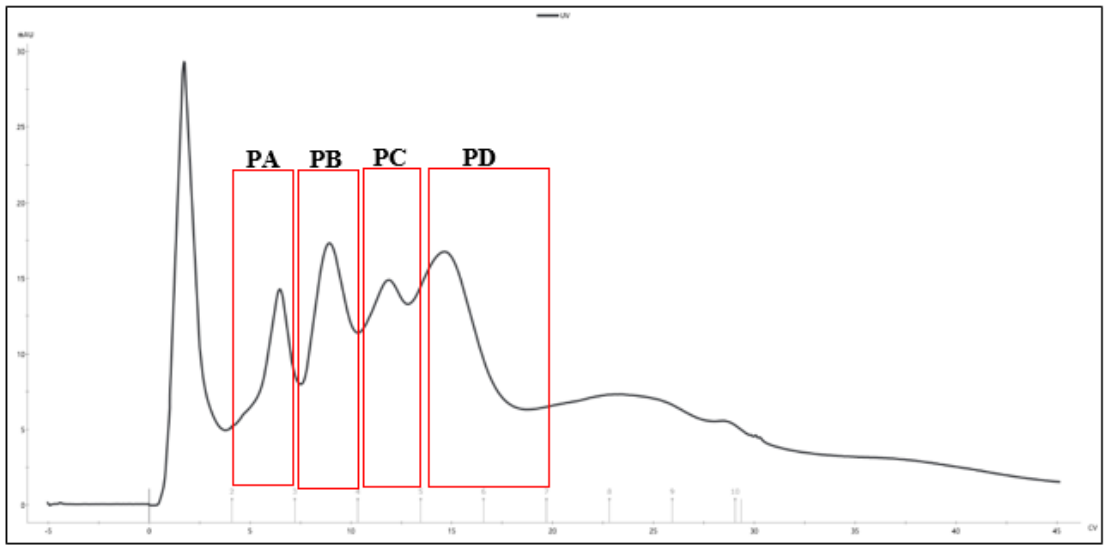
Çörek otu protein konsantreleri ve farklı sürelerde papain ve tripsin enzimleri kullanılarak elde edilen hidrolizatlarla yapılan analizler sonucunda; anti-oksidatif ve anti-Alzheimer testlerinde maksimum aktivitelere yakın sonuçlar alındığı için 30 dakikalık papain ve tripsin hidrolizatlarının fraksiyonlanması uygun görülmüştür.

Papain hidrolizatları için 0-100 LG (lineer gradient) sabit olmak üzere 0.6 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 CV (column volume); 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml DEAE FF (zayıf anyonik) 25 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto Q (güçlü anyonik) 20, 25, 35 ve 40 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto S (katyonik) 20 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Butyl FF (zayıf katyonik) 20 CV parametreleri ile fraksiyonlama denemeleri yapılmıştır.

Tripsin hidrolizatları için 0-100 LG (lineer gradient) sabit olmak üzere 0.5 M NaCl tuz konsantrasyonu, HiTrap 1 ml Capto DEAE 25 ve 40 CV; 1 M NaCl tuz konsantrasyonu,

HiTrap 1 ml Capto DEAE 20 ve 30 CV; 1 M NaCl tuz konsatrasyonu, HiTrap 1 ml DEAE FF 25 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsatrasyonu, HiTrap 1 ml Capto Q 20 ve 35 CV; 1 M NaCl tuz konsatrasyonu, HiTrap 1 ml Capto S 20 ve 35 CV parametreleri ile fraksiyonlama denemeleri yapılmıştır.

Farklı parametrelerle gerçekleştirilen fraksiyonlama denemeleri sonucunda en güçlü peptit sinyalleri; anyon değişim kolonu olan HiTrap 1 ml Capto DEAE (zayıf anyonik) kolonu, 1 M tuz konsantrasyonu ve 0-100 LG 35 CV parametreleri ile papain hidrolizatlarından elde edilmiştir. PA, PB, PC ve PD olmak üzere 4 adet fraksiyon toplanmıştır. Papain fraksiyonuna ait kromatogram Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5: Papain ile 30 dakika hidroliz edilmiş çörek otu protein ekstraktlarının HiTrap 1 ml Capto DEAE (zayıf anyonik) kolon ve 35 CV ile fraksiyonlanma ve elde edilen 4 (PA, PB, PC ve PD) fraksiyonun kromatogramı.

30 dakika papain enzimi hidroliz ile optimum sonuçlar alınması nedeniyle daha kısa sürede, daha az enerji tüketilerek elde edilebilecek biyoaktif peptitlerin fraksiyonlanarak araştırılması hedeflenmiştir.

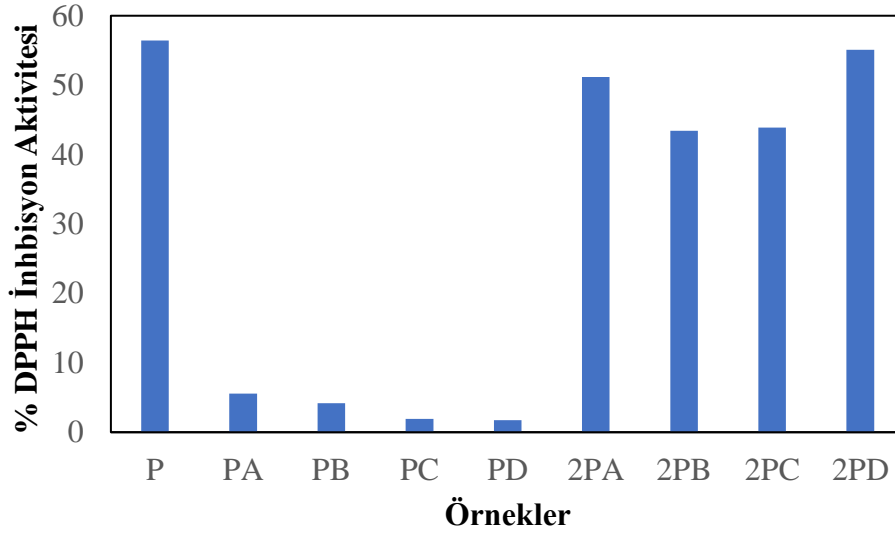
Fraksiyonların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DPPH analizinin yapılmasına karar verilmiştir.

3.2.1. Fraksiyonlanmış Peptitlerin DPPH Analizi

Çörek otu protein konsantrasyonunun papain enzimi ile 30 dakika hidroliz edilmesi sonucu 4 adet fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar PA, PB, PC ve PD olarak

adlandırılmıştır. Her bir fraksiyonun konsantrasyonu iki katına çıkarılarak DPPH testi tekrarlanmıştır. Hacimsel olarak İki katına çıkarılan fraksiyonlar; PA için 2PA, PB için 2PB, PC için 2PC ve PD için 2PD olarak adlandırılmıştır. Hidroliz edilmemiş protein konsantresi ise P olarak adlandırılmıştır. Fraksiyonlanmış çörek otu protein hidrolizatlarının ve protein konsantresinin DPPH testi sonuçları Şekil 3.6'da verilmiştir.

Fraksiyonlanmış 4 adet çörek otu protein konsantresi hidrolizalarına (PA, PB, PC ve PD) uygulanan DPPH testi sonucunda, fraksiyonlanmamış hidrolizatların DPPH testi sonuçlarına (Bkz. Şekil 3.2) göre sırasıyla % 5.55, % 4,16, % 1.92 ve % 1.71 olmak üzere oldukça düşük aktiviteler elde edilmiştir. DPPH radikaline karşı düşük anti-oksitatif etki elde edilmesi, peptit fraksiyonları içerisinde birçok bileşen olması nedeniyle (tampon çözeltiler, tuz vb.) etken madde olan çörek otu protein fraksiyonu konsantrasyonunun çok düşük kalmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 3.6: Çörek otu protein konsantresinin (P), papain enzimi ile 30 dakikalık hidrolizi sonrası fraksiyonlanmış protein hidrolizatların (PA, PB, PC ve PD) ve bu hidrolizat konsantrasyonlarının hacmen iki katına çıkarılmış (2PA, 2PB, 2PC VE 2PD) örneklerinin DPPH inhibisyon aktiviteleri (standart sapma < % 5).

Peptit konsantrasyonunun ortamda çok düşük kalmış olabileceği fikrine dayanarak DPPH testi, analizde kullanılan fraksiyon konsantrasyonu iki katına çıkarılarak tekrarlanmıştır. Yapılan bu değişiklik sonucunda fraksiyonların DPPH radikaline karşı gösterdikleri anti-oksitatif etki sırasıyla % 51.16, % 43.41, % 43.90 ve % 55.08 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6). Bu sonuçlara göre PA, PB, PC ve PD fraksiyonlarının,

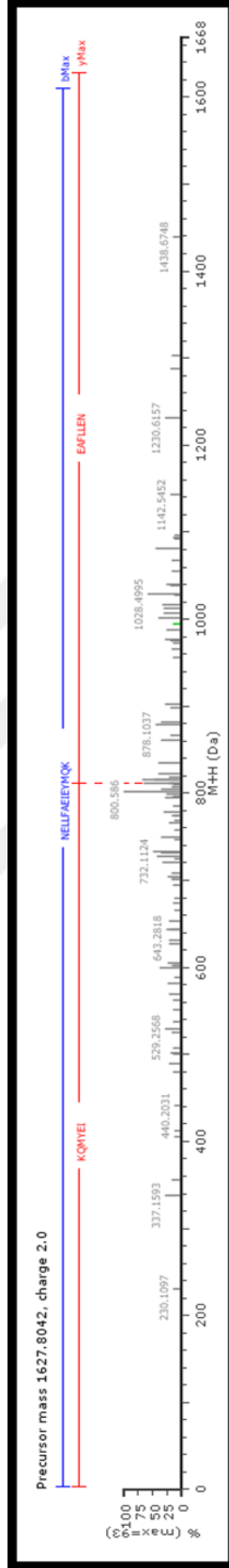
hidrolizatlar toplanırken fraksiyon cihazından gelen tampon, tuz vb. etkenler nedeniyle test ortamında düşük kaldığı ve bu nedenle düşük antioksidatif aktivite gösterdiklerini söylemek mümkündür.

Protein ve peptitlerin fraksiyonlanması işlemi oldukça uzun süren ve maliyetli bir uygulamadır. Bu nedenle; fraksiyonlanmış çörek otu protein hidrolizatlarının, enzim ile hidrolize edilmemiş ve fraksiyonlanmamış çörek otu protein konsantresi ile kıyaslanması uygun görülmüştür. Çörek otu protein konsantresi ile yapılan DPPH testi sonucu % 56.43 oranı ile fraksiyonların konsantrelerinin iki katına çıkarılmadan yapılan analiz sonuçlarına göre oldukça yüksek çıkmıştır. Fraksiyon konsantrasyonlarının iki katına çıkarılmasıyla ise konsantrasyonu artırılmış fraksiyonların DPPH testi sonuçları birbirine yakın değerlerde (% 51.16, % 43.41, % 43.90 ve % 55.08) elde edilmiştir. Buradaki kritik nokta ise antioksidatif etkiyi gösteren etken maddenin konsantrasyonu ve her bir etken maddenin bağlı etkinliğidir. Fraksiyonlanmış örneklerin konsantrasyonlarının artırılmasıyla aktivitenin de artması antioksidatif etki gösterecek peptitlerin varlığına işaret etmektedir. Bununla beraber, enzimatik işlem ya da fraksiyonlama işlemi olmaksızın çörek otu protein konsantrelerinin antioksidan etki göstereceği göz önünde bulundurulmalıdır.

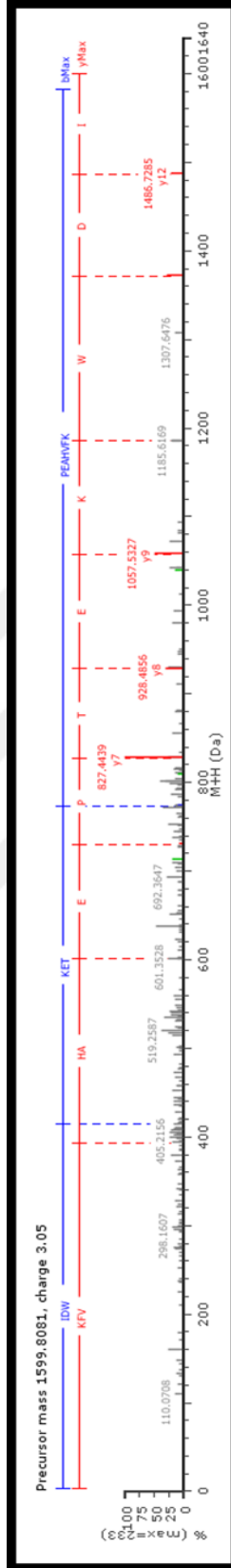
3.3. LC-Q-TOF/MS Analizi

Önceki bölümlerde (tripsin ve papain muameleleri) tarif edildiği üzere anti-asetilkolinesteraz aktivitesi ve antioksidatif aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-Q-TOF/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen bazı örnek spektrumlar aşağıda sunulmaktadır (Şekil 3.7-3.9). Özellikle papain muamelelerinde antioksidatif fraksiyonların başarılı bulunduğu göz önüne alınarak bu fraksiyonlar LC-Q-TOF/MS analizlerine tabi tutulmuştur.

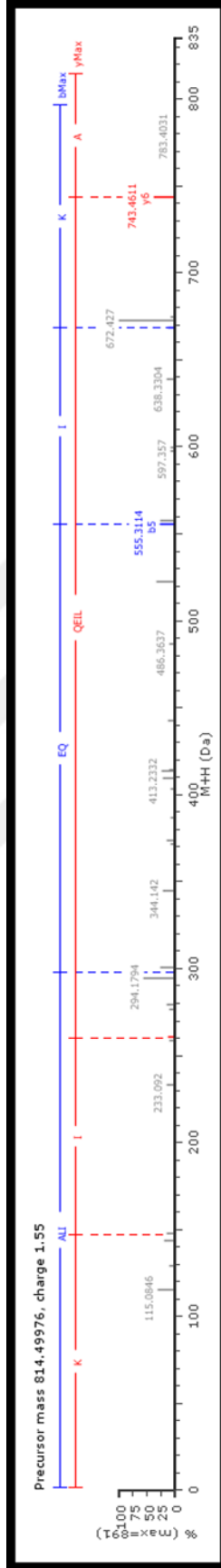
Grubumuzun elinde şu anda bu aktif fraksiyonlarda bulunmuş 16 farklı peptit spektrumu vardır. Dolayısıyla sadece örnek birkaç sunum yapılacaktır.



Şekil 3.7: PA fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum NELLFAEIEYMQK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 3.8: PB fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum IDWKETPEAHVFK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.



Şekil 3.9: PC fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum ALIEQIK peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

Grubumuzun elinde Şu anda bu aktif fraksiyonlarda bulunmuş 16 farklı peptit spektrumu vardır. Özetle, çalıŐtıĐımız proteinlerden elde edilen enzimatik hidrolizatların fraksiyonlarını aldıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF-MS sisteminde analizler tamamlanmıŐtır. Analiz edilen peptit moleküllerini Uniprot, PLGS, vb. data bankalarındaki proteinlerle eŐleŐtirerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiŐtir. Bu durum yeni protein varlığına ya da daha önce bu data bankalarına iŐlenmemiŐ çörek otu proteinlerine işaret etmektedir. Dolayısıyla, de novo sekanslama yapılması gerekmektedir. Bu durum ekstra bir maliyet ve iş yükü oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu aşamada bu iŐlemlerin tamamlanması olanağı bulunmamaktadır.

3.4. In Silico Analizler

LC-Q-TOF/MS Analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karŐılaŐtırmalar yapılarak numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları ve muhtemel olarak hangi çörek otu proteininden koptukları belirlenmiştir (Tablo 3.1-3.7). Buna ek olarak, literatürde tarif edilen bir dizi *in silico* analiz tekniği kullanılarak peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi işlemleri tamamlanmıŐtır (Tablo 3.1-3.7).

Tablo 3.1-3.7 üzerinden incelenebileceği gibi peptitlerin hiçbirinde toksik etkiler ortaya çıkması beklenmemektedir.

Sayıca az da olsalar fraksiyonlarda bazik peptitler bulunmuştur. Bu peptitlerin bazılarının antimikrobiyal etkiler de dahil olmak üzere daha sonra incelenecek bazı yenilikçi özelliklerinin olması beklenebilir.

Genel olarak, veri tabanı analizlerinin sonuçlarından da anlaşılabilceği gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, Şu aşamada elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eŐleŐmemiŐtir. Dolayısıyla bulgularımızın bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir. Grubumuzun bu bağlamda patent baŐvurusu ön hazırlığı hâlihazırda devam etmektedir. Bu konu ile ilgili verilerin değerlendirilmesi çalışmaları da benzer şekilde sürdürölmektedir. Anti-oksidatif fraksiyonlardan analizi tamamlanmıŐ 16 farklı peptit bulunmaktadır. Bu peptitlerle ilgili değerlendirmeler aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 3.1-3.7).

Tablo 3.2: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PA				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	ASADTSNTGSVSE-ANAQYYQQEAGKLK	2820,27	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.68
2	GRLYEYSNNSVK	1429,71	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	8.83
3	NELLFAEIEYMQK	1643,796	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.26
4	NELLFAEIEYMQKR	1783,891	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.79
5	NFLQVNLLEANNYSR	1910,915	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	6.35
6	QVTFCK	782,3929	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	8.57
7	TQQHMSLMPTN-EYEVISSAPFDSR	2768,246	AGAMOUS1-like protein [<i>Nigella damascena</i>]	4.66

Tablo 3.3: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PA fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,5632	antioksidatif	0.1111	-
2	toksik değil	0,168664	antioksidatif	0.1667	-
3	toksik değil	0,222255	antioksidatif	0.0769	-
4	toksik değil	0,2752	antioksidatif	0.0714	-
5	toksik değil	0,206773	ACE inhibitör	0.2500	0.0032733-199227497
6	toksik değil	0,34829	antioksidatif	0.1667	-
7	toksik değil	0,120965	ACE inhibitör	0.2500	0.015794-466320564

PA fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > % 50 olan bir peptit bulunmuştur (ASADTSNTGSVSEANAQYYQQEAGKLK).

In silico değerlendirmelerde, antioksidatif peptitler ile ilgili olarak öncelikle anti-oksidatif parametreler sıralanmıştır. Bu parametrelerin hesaplanamadığı durumlarda ACE inhibisyon parametreleri listeye eklenmiştir.

Tablo 3.4: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PB				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	ENLPTK	701,3828	hypothetical protein AQUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	6,6
2	ENLPTK-DQISPYFR	1707,871	hypothetical protein AQUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	6,65
3	IDWKET-PEAHVFK	1599,808	hypothetical protein AQUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	5,26
4	LAICQVVG-DDLLMSNPK	1872,956	hypothetical protein AQUCO_00300193v1 [Aquilegia coerulea]	3,94
5	LPENA-KVDEVK	1241,664	hypothetical protein AQUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	4,57
6	PICESLNILE-YIDEIWP HNR	2511,221	hypothetical protein AQUCO_05500003v1 [Aquilegia coerulea]	4,28
7	SIEISG	605,3133	hypothetical protein AQUCO_03000169v1 [Aquilegia coerulea]	3,64
8	YDLDFK	800,3825	hypothetical protein AQUCO_00300193v1 [Aquilegia coerulea]	3,94

Tablo 3.5: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PB fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,5632	ACE inhibitör	0.134613	-
2	toksik değil	0,168664	antioksidatif	0.230629	-
3	toksik değil	0,222255	antioksidatif	0.303865	-

4	toksik değil	0,222255	ACE inhibitör	0.349182	0.017499-924998687
5	toksik değil	0,2752	ACE inhibitör	0.0855059	0.006993-006993007
6	toksik değil	0,206773	antioksidatif	0.521679	
7	toksik değil	0,34829	ACE inhibitör	0.120602	1.9607843-137255E-5
8	toksik değil	0,120965	ACE inhibitör	0.557286	0.0004590-1037363444

PB fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > %50 olan 2 peptit bulunmuştur (PICESLNILEYIDEIWP HNR ve YDLDFK).

Tablo 3.6: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PC				
Peptit No	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Protein Kaynağı	pI
1	AICLHPLVC-KGFNADFD-GDQMAVHI-PLSLEAQAEAR	3994,926	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,8
2	ELGEEGP-ADNEWEDR	1745,717	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	3,72
3	GLFEYEIQSWK	1399,6711	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,54
4	PTPGEL-VMCQEK	1388,6486	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	4,54
5	RVDYSGR	852,4402	RNA polimeraz beta (kloroplast) [<i>Nigella damascena</i>]	9,1

Tablo 3.7: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile elde edilmiş aktif çörek otu peptitlerine ait PC fraksiyonunun biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Fraksiyon PC					
Peptit No	Toksosite	Peptide Ranker	Aktivite	A Parametresi	B Parametresi
1	toksik değil	0,040593	antioksidatif	0.0556	-
2	toksik değil	0,219454	antioksidatif	0.0667	-
3	toksik değil	0,378953	ACE inhibitör	0.4545	0.034362245010862
4	toksik değil	0,218156	antioksidatif	0.0833	-
5	toksik değil	0,221694	ACE inhibitör	0.4286	0.0014900210084034

PC fraksiyonunda biyoaktif olma ihtimali (PeptideRanker değeri) > %50 olan hiçbir peptit bulunamamıştır.

Bu değerlendirmeler sonucunda, aktif fraksiyonlarının içinde hem aktif, hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre (PeptideRanker) peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) antioksidatif inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* antioksidatif aktivitesi bulgularanan, hem de bu aktiviteyi *in silico* tekniklerce doğrulanan 1 örnek peptidin asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd. 2012 – PepSite2). Bu bağlamda aşağıdaki Şekil 3.10 ve Tablo 3.7’de söz konusu inhibitör peptitlerin AChE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin AChE’nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği özetlenmiştir.

In vitro antioksidatif analizler ve AChE analizleri aynı fraksiyonlarla yürütüldüğü için burada gözlenen en etkin peptitlerden biri ile AChE etkileşimleri de incelenmiştir.

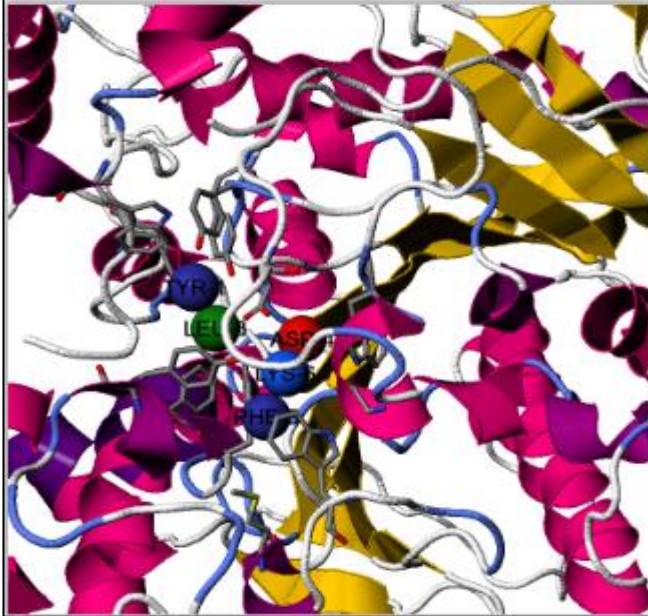


Displaying prediction ranked at position 1.

To display a different prediction, click on the corresponding row from the table below, which shows the top matches ranked according to statistical significance (p-value).

rank	p-value	N						
1	0.0005206	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
2	0.0006081	5	---	asp-2	leu-3	aso-4	phe-5	lys-6
3	0.0006499	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
4	0.0007174	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
5	0.0008395	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
6	0.0008514	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
7	0.00086	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
8	0.0008972	5	tyr-1	---	leu-3	asp-4	phe-5	lys-6
9	0.0009285	5	tyr-1	asp-2	leu-3	---	phe-5	lys-6
10	0.0009379	5	tyr-1	asp-2	leu-3	---	phe-5	lys-6

Each row from the table above is colored according to statistical significance (p-value) following the color scale below (red = highly significant; yellow = moderately significant; white = not significant).



Şekil 3.10: PB fraksiyonu peptitleri arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve

inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı % 200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Tablo 3.8: YDLDFK peptidinin AChE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif Amino Asitler	p-Değeri	AChE üzerinde Bağlanılan Amino Asitler
YDLDFK	Tyr-1 Leu-3 Asp-4 Phe-5 Lys-6	0.0005206	Tyr72, Asp74, Gly82, Trp86, Tyr124, Trp286, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341, Tyr439, Met443

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 6 amino asitten oluşan YDLDFK peptidi, AChE üzerinde 12 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için AChE'nin toplamda 614 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Serbest radikal türlerin fazla miktarda oluşması oksidatif strese neden olmaktadır (Soholm, 1998). Yapılan araştırmalar oksidatif stresin diyabet, kanser, şizofreni, Alzheimer gibi birçok hastalığın patolojisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Chakrabarti, Jahandideh ve Wu, 2014). Serbest radikallerin hücrel yaşlanma ve nöral hasara yol açtığı bildirilmiştir (Sastre, Pallardo ve Vina, 2000). Demir iyonunun yaşın artmasıyla beraber beyinde ve nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen beyin alanlarında biriktiği belirlenmiştir. Bu nedenle Alzheimer hastalığına karşı kullanılacak herhangi bir ajanın AChE inhibitör etkisiyle beraber antioksidatif etkisinin de olması oldukça avantajlıdır (Şenol vd., 2010).

Biyoaktif peptitlerin, çeşitli hastalıkların oluşmasını önleme ve tedavi etmedeki potansiyellerini ve etki mekanizmalarını araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (Cicero, Fogacci ve Colletti, 2017; Hartmann ve Meisel, 2007). Yapılan çeşitli çalışmalarda elde edilen aktiviteler ile aktiviteyi gösteren peptidin kimyasal yapısı arasında doğrudan ilişki kurulamamıştır. Bununla beraber biyoaktivitenin; peptit zincirinin uzunluğu, peptidi oluşturan amino asitlerin yük ve polariteleri ve amino asit dizini gibi özelliklerle ilgili olduğu belirtilmektedir (Li ve Yu, 2015).

Moleküler ağırlığı daha düşük olan peptitlerin biyoaktivitelerinin daha yüksek olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; papain enzimi ile çözünür ve çözünmez balık proteinlerinde gerçekleştirilen hidroliz sonucu, 5 kDa'dan küçük fraksiyonların fonksiyonel gıdalarda kullanımlarının uygun olduğu belirtilmiştir (Salampessy vd., 2017). *L. helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmaları kullanılarak fermente edilmiş süttten izole edilen Ile-Pro-Pro ve Val-Pro-Pro peptitlerinde, ACE enzimini inhibe etme ve uzun süreli kullanım sonucu sıçanlarda hipertansif etki sağladığı gözlenmiştir (Moller vd., 2008). Bir diğer çalışmada, yumurta proteinlerinin hidroliz edilmesi sonucu Ile-Arg-Trp, Ile-Gln-Trp ve Leu-Lys-Pro olmak üzere üç adet *in vitro* ACE inhibe edici hidrolizat elde edilmiştir (Majumder vd., 2015). Bu sonuçlar biyoaktif peptitlerin genellikle düşük moleküler ağırlığına sahip olduğunu göstermektedir.

Tripsin enzimi ile hidroliz işleminin ardından darıdan izole edilen peptitlerin antioksidatif potansiyelleri DPPH, ABTS, Hidroksil radikali tutma aktivitesi gibi farklı testlerle değerlendirilmiştir ve yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir (Agrawal, Joshi ve Gupta, 2016). Papain ve alkalın proteaz enzimleriyle hidroliz edilen *Spirulina platensis*'ten, *Escherichia coli* (minimum 8 mg/mL) ve *Staphylococcus aureus* (minimum 16 mg/mL) için inhibe edici özellikte olan antibakteriyel peptit elde edildiği belirtilmiştir (Yücepe ve Özçelik, 2016).

Antioksidanların gıda endüstrisinde; gıdaların depolanması ve korunması aşamalarında oldukça önemli oldukları bilinmektedir (Finley ve Given, 1986). Yağ içeriğine sahip gıdaların depolanma aşamasında görülebilen yağ acılaşması; gıdanın renk, tat, aroma ve yapı özelliklerini bozarak besin kalitesinin düşmesine sebep olmaktadır. Gıda ürünlerinin kalitesini bozarak raf ömrünün kısaltan ve yağ acılaşmasına neden olan lipid oksidasyonunun ve oksidasyon sonucu oluşacak toksik ürünlerin önlenmesi amacıyla antioksidanlar kullanılmaktadır (Finley ve Given, 1986). İnsan sağlığı açısından sentetik antioksidanların toksik olabilme potansiyeline sahip oldukları yönünde bilgilerin paylaşılmasıyla, işlenmiş ürünlere tüketicilerin sağlık ve güvenlik arayışları diğer beklentilerin önüne geçmiştir. Bu nedenle doğal antioksidanların araştırılması oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Dünya üzerinde geniş bir zenginlik ve dağılıma sahip olan bitkiler, doğal antioksidanların elde edilmesi amacıyla araştırmacılar için önemli kaynaklar haline gelmiştir (Nandita ve Rajini, 2004).

Doğal ve bitkisel kaynaklı antioksidan arayışlarının artmasıyla beraber ucuz ve bol olmaları yönüyle de bitkisel ham maddelerden geriye kalan endüstriyel yan ürünler dikkat çekmektedir. Geçmişten günümüze kadar birçok hastalığın tedavisinde geleneksel anlamda kullanılan ve oldukça fayda görülen çörek otu kullanılarak üretilen proteinlerin ve biyoaktif peptitlerinin insan sağlığına fayda sağlama potansiyelinin araştırılması daha önceden incelenmemiş bir konudur. Çörek otu proteinlerinin incelenmesine yönelik ekibimizin yapmış olduğu “2D Jel Elektrofrezisi ve MALDI-TOF/TOF-MS analizleri ile çörek otu tohumlarından yeni proteinlerin belirlenmesi” ve “ekstraksiyon koşullarının çörek otu protein konsantrasyonlarının yapısal ve fonksiyonel özelliklerine etkisi ve hidrolizatlarının ACE inhibisyonu” çalışmaları ile çörek otu proteinlerinin yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır (Çakır ve Gülseren, 2019; Coşkun vd., 2019).

Bir yağlı tohum olan çörek otunun yağının soğuk pres ile alınması sonrası oluşan posalar hem çevre kirliliğinin azaltılmasını sağlayacak bir ürün olması, hem de bünyesinde bulunan değerli bileşenlerin biyoaktif potansiyelinin araştırılması amacıyla tez kapsamında çalışılmıştır. Enzimatik hidroliz için kullanılan papain ve tripsin enzimleri, literatürde yapılan birçok çalışmada olumlu sonuç vermeleri nedeniyle tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalarda hem çörek otu protein konsantrasyonunun hem de her iki enzimle hidroliz edilmiş örneklerin *in vitro* olarak antioksidatif etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Numunelerin etki dereceleri, enzim çeşidi ve hidroliz derecesinden belirgin ölçüde etkilenmektedir.

Günümüzde Alzheimer hastalığı için önemli bir araştırma alanı olan AChE inhibitörlerinin çörek otu protein ya da hidrolizatlarında bulunma potansiyeli de *in vitro* olarak çalışılmıştır. Çörek otu proteinlerinin kısmen AChE inhibitör aktivitesine de sahip olduğu bulgulanmıştır. Bu analiz kapsamında daha detaylı çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmaları kapsamında yapılan analizler sonucunda çörek otu protein ve hidrolizatlarının hem anti-oksidatif hem de AChE inhibitör etkisi göstermiş olmaları; oksidatif stresin birçok hastalığı ve zamanla Alzheimer hastalığının oluşumunu tetiklediğini belirten çalışmalara dayanarak, çörek otu posasının katma değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla yağ alınmış çörek otu posalarından elde edilecek biyoaktif peptitler katma değerli ürünlere dönüştürülme potansiyeline sahiptir.

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.
- Agrawal, H., Joshi, R. ve Gupta, M. (2016). Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 204: 365-372.
- Agyei, D. ve Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29: 272-277.
- Ahmad, A., vd. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5): 337-352.
- Ahsan, M.N. ve Watabe, S. (2001), Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. *Journal of Protein Chemistry* 20(1): 49-58.
- Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 112-120.
- Alfredo, V.O., vd. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L). *LWT-Food Science and Thecnology*, 42(1): 168-173.
- Al-Gaby, A.M.A. (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *N. sativa* (black cumin) cake protein. *Nahrung*, 42(5): 290-294.
- Al-Jassir, M.S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 45: 239–242.
- Aluko, R.E. (2004). The extraction and purification of proteins: an introduction, in *Proteins in Food Processing*, pp. 323-346, Eds. Yada, R.Y., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.

- Alupului, A., Calinescu, I. ve Lavric, V. (2009). Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. *In Proceedings of the AIDIC Conference Series, Vol. 9*, pp. 1-8, Italy.
- Al-Yahya, MA. (1986). Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia*, 57(3): 179-82.
- Amri, E. ve Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2): 99-104.
- Anonim, (2014). Proposal for new work on Codex Standart for Brown/Black Cumin (Whole and Ground), (prepared by India). Joint FAO/ WHO Food Standards Programme.
- Anonim, (t.y.). <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=black+cumin&sort=score>, (16 Eylül).
- Arntfield, S.D. (2000). Proteins from oil-producing plants. *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 146-167.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J. ve Eijsink, V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40(5): 1957–66.
- Aydemir, L.Y., vd. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocolloids*, 36: 130-142.
- Ayhan, B. (2012). *Nigella sativa* L. bitkisi üzerine fitoterapötik çalışmalar (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bandyopadhyay, K. ve Ghosh, S. (2002). Preparation and characterization of papain modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6854-6857.
- Bargeman, G. vd. (2002). The development of electro-membrane filtration for the isolation of bioactive peptides: the effect of membrane selection and operating parameters on the transport rate. *Desalination*, 149(1–3): 369–74.
- Baydar, H. (2009). Science and technology of medicinal and aromatic plants. *Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture*.

- Batır, S.B. (2018). *Physicochemical and functional properties of Phaseolus coccineus L. protein isolate obtained by isoelectric precipitation method* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Beach, T.G. (2000). The Cholinergic deficit coincides with ab deposition at the earliest histopathologicstages of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, 54(9): 308-313.
- Becker, E.M., Nissen, L.S. ve Skibsted L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Techonology*, 219(6): 561-571.
- Bisswanger, H., Nouaimi, M. ve Klaus, M. (2001). Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 567-574.
- Boye, J.I., vd. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43: 537–546.
- Brady, R. vd. (2008). Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients — a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 243–248.
- Bugg, T. (1996). *An Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Bulca, S. (2014). Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(2): 29-36.
- Butré, C.I. vd. (2015). Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 44: 44–53.
- Candan, F., vd. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 215-220.

- Chabeaud, A. vd. (2009). Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, 66(3): 463–71.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F. ve Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 12.
- Chakrabarti, S., Guha, S. ve Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, 10(11): 1738.
- Chavan, U.D., McKenzie, D.B. ve Shahidi, F. (2001). *Functional properties of protein isolates from beach pea (Lathyrus maritimus L.)*, 74(2): 177-187.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7): 254-262.
- Cohen, L.W., Coghlan, V.M. ve Dihel, L.C. (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene*, 48: 219-227.
- Contreras, M.D.M. vd. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1): 9–15.
- Coşkun, Ö., vd. (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: 2328–2338.
- Çakaloğlu, B., Özyurt, V.H. ve Ötleş, S. (2018). Cold press in oil extraction (A review). *Ukrainian Food Journal*, 7(4): 640-654.
- Çakır, B. ve Gülseren, İ. (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: 414–420.
- Cicero, A.F.G., Fogacci, F. ve Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology*, 174: 1378–1394.

- Çokgezen, J. (2007). Avrupa Birliği Çevre Politikası ve Türkiye. *Marmara Üniversitesi İ.İ.B.F. Dergisi*, 23(2): 91-115.
- Daliri, E.B.M., Oh, D.H. ve Lee, B.H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5): 32.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins, in *Protein Functionality in Food Systems*, New York, 1-39.
- Dando, W.A. (2012). Food and famine in the 21st Century (2 volumes). ABCCLIO, United States.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32: 25-42.
- Demirci, M. (2011). Beslenme. (Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 44. 5th ed., Vol. 1, pp 63), Tekirdağ.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. ve Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1): 161-169.
- Durmuş, E.F. ve Evranuz, Ö. (2005). Proteinlerin gıda teknolojisi alanındaki önemi. <http://www.dunyagida.com.tr/haber/proteinlerin-gida-teknolojisi-alanindaki-onemi/1387> [2 Mart, 2015].
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F. ve Nabavi, S.M. (2009). Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(5): 447-450.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. ve Bekhradnia, A.R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18): 3188-3192.
- EC 2015. EU Action for the Circular Economy. 02.12.2015. EUR-Lex - 52015DC0614 – EN.
- Edwin, F. ve Jagannadham, M.V. (2000). Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1479: 69-82.

- Edwin, F., Sharma and Jagannadham, M.V. (2002). Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1479: 69-82.
- El-Fattah, A.M.A. vd. (2017). Bioactive peptides with ACE-I and antioxidant activity produced from milk proteolysis. *International Journal of Food Properties*, 20(12): 3030-3042.
- Erdmann, K., Cheung, B.W.Y. ve Schröder, H. (2007). The possible roles of food-driven bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 643-654.
- Erickson, D.R. (2015). Practical handbook of soybean processing and utilization. Elsevier, United States.
- Ermumcu, M.Ş.K. ve Şanlıer, N. (2017). Black cumin (*Nigella sativa*) and its active component of thymoquinone: Effects on health. *Journal of Food and Health Science*, 3(4): 170-183.
- Eryılmaz, H.S. (2016). *Bir bitkisel gıda atığı olarak vişne çekirdeğinden elde edilen proteinlerin fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Esteve, C., Marina, M.L. ve García, M.C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167: 272–280.
- Escamilla-Silva, E.M., vd. (2003). Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 972–979.
- FAO, I, WFP, “The State of Food Insecurity in The World 2013”, (2013).
- Fersht, A. (1998). Structure and mechanism in protein science, Freeman and Company, ABD.

- Finley, J.W. ve Given, P.J.R., (1986). Technological necessity of antioxidants in the food industry. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10/11): 999-1006.
- Fitzgerald C. vd. (2014). Potential of a renin inhibitory peptide from the red seaweed *Palmaria palmata* as a functional food ingredient following confirmation and characterization of a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62: 8352–8356.
- Fitzgerald, R.J., Murray, B.A. ve Walsh, D.J. (2004). The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. *The Journal of Nutrition*, 134: 980–988.
- Frankel, E.N. ve Meyer, A.S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1941.
- Fong, H.H. (2002). Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integrative Cancer Therapies*, 1: 287–293.
- Gao, Q., Smith, J.C. ve Tsopmo, A. (2014). Optimized Protamex digested oat bran proteins: antioxidant properties and identification of new peptides. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(10): 1053.
- Garcia, M.C., vd. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106: 328-349.
- Gençcelep, H. (2008, Mayıs). Et proteinlerinin fonksiyonel özellikleri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi 2008*. Erzurum.
- Ghaly, A.E. ve Alkoaik, F.N. (2010). Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. *American Journal of Applied Sciences*, 7(3): 331- 342.
- Gharby, S., vd. (2015). Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14: 172-177.
- Gobbetti, M., Smacchi, E. ve Corsetti, A. (1996). The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a

- proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3220–6.
- Gobbetti, M., Minervini, F. ve Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 172-188.
- González-García, E., Marina, M. L. ve García, M. C. (2014). Plum (*Prunus Domestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods*, 11: 428–437.
- Goreja, W. G. (2003). Black seed: nature’s miracle remedy. New York, NY7 *Amazing Herbs Press*.
- Gorinstein, S., vd. (2002). Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82: 1166-1170.
- Göğüş, F. ve Fadiloğlu, S. (2006). Food Chemistry. Nobel Yayın Dağıtım. Ankara.
- Görgüç, A. (2018). *Susam kepeğinden protein özütlenmesinde enzimin ve ultrases işleminin etkilerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Gupta, S. vd. (2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS One*, 8(9): e73957.
- Gülseren, İ. vd. (2012). Encapsulation of tea polyphenols in nanoliposomes prepared with milk phospholipids and their effect on the viability of HT-29 human carcinoma cells. *Food Digestion*, 3(1-3): 36-45.
- Gülseren, İ. (2018). *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12: 2607-2614.
- Gülseren, İ. & Correding, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13): 3242-3251.

- Gün, M. (2012). Kutsal tohum (*Nigella sativa*): Çörek otunun iyileştirici etkisine ilişkin bazı bilgiler. *Lokman Hekim Dergisi*, 2(1): 43-46.
- Gürpınar, G.Ç., Geçgel, Ü. ve Taşan, M. (2011). Soğuk presyon tekniği ile üretilen bitkisel yağların özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. 7. *Gıda Mühendisliği Kongresi 2011*, Ankara.
- Hadi, M.Y., Mohammed, G.J. ve Hameed, I.H. (2016). Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy Phytotherapy*, 8(2): 8-24.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- Hanafy, M.S.M. ve Hatem, M.E. (1991). Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2- 3): 275-278.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D.L. ve Niranjana, K. (2001). Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(8): 817-821.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D.L. ve Niranjana, K. (2002). Enzyme-assisted water extraction of oil and protein from rice bran. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(7): 771-776.
- Haq, A. vd. (1999). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immunopharmacology*, 21(4): 283-295.
- Harnedy, P.A. ve FitzGerald, R.J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 6-24.
- Hartmann, R. ve Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163- 169.
- Hassanien, M.F.R., vd. (2015). Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10): 6136-6142.

- He, Y., Zhong, W. ve Yeung, E.S. (2002). Multiplexed on-column protein digestion and capillary electrophoresis for high-throughput comprehensive peptide mapping. *Journal of Chromatography*, 782: 331 – 341.
- Hosseinimehr, S.J. vd. (2007). *In vitro* antioxidant activity of *Polygonum hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 637-640.
- Hourigan, J.A. ve Chesterman, C.F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2): 141-146.
- Huang, Q. vd. (2015). Optimizing preparation conditions for Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of ovalbumin. *Food Science and Biotechnology*, 24: 2193–2198.
- Huang, Y.L. vd. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and hypocholesterolemic activities: Effects of protein hydrolysates prepared from *Achatina fulica* snail foot muscle. *International Journal of Food Properties*: 3102-3111.
- Hüriyet, Z. (2014). *Soğuk presten çıkan kapyra biber tohumu unlarından protein izolasyonu ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Issaq, H.I. vd. (2002). Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis*, 23: 3048–3061.
- Issaq, H.J. ve Veenstra, T.D. (2013). Sample depletion, fractionation, and enrichment for biomarker discovery. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, 237-244.
- İmer, Y. ve Taşan, M. (2018). Çeşitli soğuk pres yağların bazı mikro ve makro element içeriklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1): 14-25.
- Jambrak, A.R. vd. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93: 386–393.

- Jenkins, D.J., vd. (2000). Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity-a controlled crossover trial. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 49(4): 537-543.
- Jiang, B. vd. (2014). Food safety: Food analysis technologies/techniques. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 273-288.
- Jiao, J., vd. (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 147: 17-24.
- Kang, K. vd. (2006). The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) latex particles. *Materials Science and Engineering*, 26(4): 664-669.
- Kanu, P.J., vd. (2007). Sesame Protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry*, 2(5): 289-301.
- Karaca, A.C., Low, N. ve Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9): 2742-2750.
- Keklikçi, A. ve Selçuk, Z. (2018). Domates posasının ruminantlar için sindirilebilirliğinin belirlenmesi. *Veteriner Hekim Derneği Dergisi*, 89(2): 58-65.
- Khalid, E.K., Babiker, E.E. ve El Tinay, A.H. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82: 361-366.
- Khiari, Z., Ndagijimana, M. ve Betti, M. (2014). Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry Science*, 93: 2347-2362.
- Kılıç, C. ve Arabacı, O. (2016). Çörek otu (*Nigella sativa* L.)'nda farklı ekim zamanı ve tohumluluk miktarının verim ve kaliteye etkisi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(2): 49-56.

- Kim, S.K. ve Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*, 2(1): 1–9.
- Kitani, Y. vd. (2007). Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. *FEBS Journal*, 274: 125–136.
- Kitts, D.D. ve Weiler, K.A. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309-1323.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1: 177–187.
- Korhonen, H. ve Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945-960.
- Korhonen, H. ve Pihlanto, A. (2003). Food-driven bioactive peptides – Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16): 1297-1308.
- Koçancı, F.G. ve Aslım, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture and Life Science*, 6(1): 19-35.
- Koşar, İ. ve Özel, A. (2018). Çörekotu (*Nigella sativa* L.) çeşit ve popülasyonlarının karakterizasyonu: I. Tarımsal özellikler. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22(4): 533-543.
- Krajcovicova-Kudlackova, M., Babinska, K. ve Valachovicova, M. (2005). Health benefits and risks of plant proteins. *Bratislavské Lekárske Listy*, 106(6/7): 231.
- Kukongviriyapan, V. vd. (2008). Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E- β thalassemia. *Pediatric Cardiology*, 29: 130-135.
- Lafarga, T. ve Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and byproducts: Generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98(2): 227–239.
- Lahrichi, S.L., vd. (2013). Food peptidomics: Large scale analysis of small bioactive peptides – A pilot study. *Journal of Proteomics*, 88: 83-91.

- Lassoued, I. vd. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics*, 128: 8–17.
- Lee, S.Y. ve Hur, S.J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228: 506–517.
- Li-Chan, E.C.Y. (2004). Properties of proteins in food systems: an introduction, in *Proteins in Food Processing*, pp. 2-22, Eds. Yada, R.Y., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, İngiltere.
- Li, Y. ve Yu, J. (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of Medicinal Food*, 18: 147–156.
- Liang, H.N. ve Tang, C.H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33: 309-319.
- Lin, H., Wu, L. ve Wang, S. (2012). Food chemistry, Chapter 5, Proteins. Nova Science Publishers, Inc., 2012. ProQuest EBook Central.
- Lopez-Vargas, J.H., vd. (2013). Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2): 756-763.
- Lu, J. vd. (2010). Purification and characterization of an angiotensin 1 -converting enzyme inhibitory peptide derived from *Spirulina platensis*. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 37(5): 568-574.
- Madej, K. (2009). Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(4): 436-446.
- Mahmoud, M.R., El-Abhar, H.S. ve Saleh, S. (2002). The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 1–11.
- Majumder, K. vd. (2015). Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 13: 50–60.

- Malmsten, M. ve Larsson, A. (2000). Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18: 277-284.
- Manadas, B. vd. (2014). Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert Review of Proteomics*, 7(5): 655-663.
- Marugg, J. vd. (1995). Medium dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *Journal of Bacteriology*, 177(11): 2982–2989.
- Matthous, B. ve Brühl, L. (2003). Quality of cold-pressed edible rapeseed oil in Germany. *Food*, 47(6): 413-419.
- Maure, A. vd. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8: 363-373.
- Meisel, H. ve Fitzgerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins; mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16): 1289-1295.
- Menard, R. vd. (1990). A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry*, 29: 6706-6713.
- Minkiewicz P. vd. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91: 965-980.
- Mojica, L. ve Mejía, E.G. (2017). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins, their characterization and biological potential. *Food Functionality*, 7: 713–727.
- Moller, N. P. vd. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47: 171–182.
- Mooney, C., vd. (2012). Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PloS One*, 7(10): e45012.

- Morales—Polanco, E. vd. (2017). Functional and textural properties of a dehulled oat (*Avena sativa* L) and pea (*Pisum sativum*) protein isolate cracker. *LWT-Food Science and Technology*, 86: 418-423.
- Mostovenko, E. vd. (2013). Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics. *EuPA Open Proteomics*, 30-37.
- Moure, A., vd. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International*, 39(9): 945-963.
- Möller, N.P vd. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4): 171–82.
- Nandita, S. ve Rajini, P.S. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry*, 85: 611-616.
- Nguyen, H.Q. ve Dao, D.T.A. (2017). Release bioactive peptides from soybean by optimization the enzymatic hydrolysis by alcalase and protamex using response surface methodology. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(2): 137.
- Ohshima, T., Sato, M. ve Saito, M. (1995). Selective release of intracellular protein using pulsed electric field. *Journal of Electrostatics*, 35(1): 103-112.
- Omar, A. vd. (1999). High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L). *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 19: 757 – 62.
- Oreopoulou, V. ve Tzia, C. (2006). Utilization of plant by-products for the recovery proteins, Dietary Fibers, Antioxidants and Colorants. *Springer*, 209-232.
- Orhan, G., Orhan, I., ve Sener, B. (2006). Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer’s disease. *Letters in Drug Design and Discovery*, 3: 268–274.
- Oroian, M. ve Escriche, I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74: 10-36.
- Owusu- Apenten, R. (2004). Introduction to food chemistry. CRC Press, 81-102, USA.

- Özcan, T. ve Delikanlı, B. (2011). Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2): 77-88.
- Özçelik, U. ve Bayram, İ. (2012). Çörek otunun (*Nigella sativa*) kuzularda besi performans, bazı kan ve rumen sıvısı parametreleri üzerine etkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 5(2): 27-33.
- Özdal, T., Çapanoğlu, E. ve Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51: 954-970.
- Padhye, S. vd. (2008). From here to eternity-the secret of pharaohs: therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Therapy*, 6: 495-510.
- Panyam, D. ve Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 120-125.
- Parab, S., Kulkarni, R. ve Thatte, U. (2003). Heavy metals in “herbal” medicines. *Indian Journal of Gastroenterology*, 22: 111–112.
- Pimentel, D., vd. (1975). Energy and land constraints in food protein production. *Science*, 190(4216): 754-761.
- Pimentel, D. ve Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 660-663.
- Pleissner, D. ve Lin, C.S.K. (2013). Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes*, 1: 21.
- Potter, N. ve Hotchkiss, (1995). *Journal of Food Science*, 5th edn. (Springer Sciences Business Media, New York, NY).
- Richter, B.E., vd. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6): 1033-1039.
- Rodrigues, I.M., Coelho, J.F.J. ve Carvalho, G.V.S. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109: 337-346.

- Rodsamran, P. ve Sothornvit, R. (2018). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, 241: 364-371.
- Romero-Baranzini, A.L., Yanez-Farias, G.A. ve Barron-Hoyos, J.M. (1995). A high protein product from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) by ultrafiltration, preparation and functional properties, *Journal of Food Processing and Preservation*, 19: 319-329.
- Roselló-Soto, vd. (2015). High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4): 885-894.
- Rund, D. ve Rachmilewitz, E. (2005). β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 353: 1135-1146.
- Ryder, K. vd. (2016). Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208: 42-50.
- Salampessy, J. vd. (2017). Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE inhibitory peptides from leatherjacket (*Meuschenia* sp.) protein hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 80: 430-436.
- Salem, M.L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5: 1749–1770.
- Sanchez, A. ve Varguez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1: 29–46.
- Sandberg, A.S. (2011). Developing functional ingredients: a case study of pea protein. M. Saarela (Ed.), 358-382, Woodhead Publishing Ltd.
- Sangsawad, P., Roytrakul, S. ve Yongsawatdigul, J. (2017). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. *Journal of Functional Foods*, 29: 77–83.

- Sari, Y.W., vd. (2015). Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10(8): 1138-1157.
- Sarkis, J.R., vd. (2015). Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29: 170-177.
- Sarmadi, B.H. ve Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10): 1949–56.
- Sastre, J., Pallardo, F.V. ve Vina, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49: 427–435.
- Sathe, S.K. (2012). Protein solubility and functionality. *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization*, 95-124.
- Savoire, R., Lanoiselle, J.L. ve Vorobiev, E. (2013). Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1): 1-16.
- Schleicher, P. ve Saleh, M. (1998). Black seed cumin: the magical Egyptian herb for allergies, asthma, and immune disorders. Rochester, Vermont, Healing Arts Press; p. 90.
- Segura-Campos, M. vd. (2011). Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, 27 (3): 213–226.
- Sharma, S., Singh, R. ve Rana, S. (2011). Bioactive peptides: a review. *International Journal of Bioautomation*, 15(4): 223-250.
- Sheih, I.C., Fang, T.J. ve Wu, T.K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 115(1): 279-284.
- Shinar, E. ve Rachmilewitz, E.A. (1990). Oxidation denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematology*, 27: 70-91.

- Sikirić, M., vd. (2003). Determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry. *Czech Journal of Animal Science*, 48(11): 481-486.
- Singh, P. (2011). *Antioxidant activity of food proteins and food protein hydrolysates* (Yüksek Lisans Tezi). McGill Üniversitesi, Montreal.
- Singh, J. ve Bagale, P.C. (2000). Development of a small capacity double stage compression cold press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, 43(2): 75-82.
- Singaraj, S., Onsaard, E. 2015. Production and characteristics of sesame proteins. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*, 1(1): 188-192.
- Siow, H.L. ve Gan, C.Y. (2014). Functional protein from cumin seed (*Cuminum cyminum*): Optimization and characterization studies. *Food Hydrocolloids*, 41: 178-187.
- Soholm, B. (1998). Clinical improvement of memory and other cognitive functions by *Ginkgo biloba*: Review of relevant literature. *Advances in Therapy*, 15: 54–65.
- Song, Y. vd. (2014). The application of EDTA in drug delivery systems: doxorubicin liposomes loaded via NH₄EDTA gradient. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 3611-3621.
- Stone, A.K., vd. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76: 31-38.
- Suetsuna, K. ve Chen, J.R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digests of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Marine Biotechnology* 3: 305-309.
- Sun, Y. vd. (2015). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research Technology*, 1-8.
- Şeflek, H.N. (2015). *Deneyisel diyabette Nigella sativa L. (Çörek otu) yağının ovaryum morfolojisi ve oksidan sistem üzerine etkileri* (Yüksek Lisans Tezi). Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Şenol, F.S. vd. (2010). Survey of 55 Turkish *Salvia taxa* for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 120: 34-43.
- Tahergorabi, R. & Hosseini, S.V. (2017). *Proteins, peptides, and amino acids*. Nutraceutical and functional food components effects of innovative processing techniques. Chapter 2, 15-38.
- Tauzin, J., Miclo, L. ve Gaillard, J.L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptichydrolysate of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Letters*, 531: 369-374.
- Topkaya, C. (2017). *Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyuşal ve mikrobiyoljik özelliklerine etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Torres-Llanez, M.J. vd. (2005). Bioactive peptides derived from milk proteins. *Archivos Latino americanos De Nutricion*, 55: 111–117.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, A. ve Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134(3): 1585-1588.
- Trabuco, L.G. vd. (2012). PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(W1): W423-W427.
- Trigui, I. vd. (2019). Physicochemical properties, antioxidant activity and *in vitro* gastrointestinal digestion of purified proteins from black cumin seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126: 454-465.
- Tuna, H.E. (2015). *Gıda atığı olan vişne, nar, kabak ve kayısı çekirdeklerinin kek üretiminde değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Udenigwe, C.C. ve Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71(1): 11-24.
- Ulagesan, S., Kuppasamy, A. ve Kim, H.J. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of protein hydrolysate from terrestrial snail *Cryptozona bistrialis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(12): 12-19.

- Silahtaroglu, S. vd. (2014). Fatty acid, tocopherol, mineral composition, total phenolic, flavonoid, thymoquinone content and antioxidant activity of *Nigella sativa* L. *European Journal of Chemistry*, 5(2): 263-266.
- Vatansev, H. vd. (2013). Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds used as a medical aromatic plant from East Anatolia Region, Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 25(10): 5490-5492.
- Veral, E.S. ve Yiğitbaşıoğlu, S. (2018). Avrupa Birliği atık politikasında atık yönetiminden kaynak yönetimi yaklaşımına geçiş yönelimleri ve döngüsel ekonomi modeli. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 6(1): 1-19.
- Villano, D., vd. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1): 230-235.
- Wang, L. ve Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6): 300-312.
- Wattanasiritham, L. vd. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*, 192: 156–162.
- Whitford, D. (2005). Protein expression, purification and characterization. In: *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, pp. 313-346, England.
- Wrolstad, R.E. vd. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 768.
- Yağcı, S., vd. (2006, Mayıs). Gıda atıklarının alternatif kullanım alanları. *Türkiye 9. Gıda Kongresi 2006*. Bolu.
- Yangılar, F. ve Yıldız, P.O. (2016). Gıda endüstrisinde antifriz proteinlerin önemi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2): 81-87.
- Yimer, E.M. vd. (2019). *Nigella sativa* L. (black cumin): a promising natural remedy for wide range of illnesses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 16 pages.
- Young, V.R. ve Pellett, P.L. (1994). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5): 1203-1212.

- Yust, M.d.M., vd. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, 122(4): 1212-1217.
- Yücepe, A. ve Özçelik, B. (2016). Bioactive peptides isolated from microalgae *Spirulina platensis* and their biofunctional activities. *Academic Food Journal*, 14(4): 412-417.
- Zayas, J.F. (1977). *Functionality of Protein in Food*. Berlin.
- Zhang, B. ve Zhang, X. (2013). Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Progress*, 29(5): 1230-1238.
- Zhang, Y. vd. (2015). Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63(40): 8819-8828.
- Zuorro, A. vd. (2014). Use of cell wall degrading enzymes for the production of high-quality functional products from tomato processing waste. *Chemical Engineering Transactions*, 38: 355-360.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad İnci Zent
Telefon (+90) 539 876 05 76
e-posta inci_zent@hotmail.com
Doğum Tarihi ve Yeri 24/06/1993 - İstanbul

İş Deneyimi

09/11/2017-04/05/2018 Uzun dönem proje stajyeri
Yıldız Holding/Northstar Innovation, İstanbul, Türkiye

11/07/2016-07/10/2016 Erasmus stajyeri
Rustichella D'Abruzzo SPA, Pescara, İtalya

15/06/2015-17/07/2015 Stajyer
Polen Gıda, İstanbul, Türkiye

15/12/2014-18/12/2014 Stajyer
İstanbul Halk Ekmek, İstanbul, Türkiye

15/07/2013-12/08/2013 Tercih danışmanlığı
İZÜ, İstanbul, Türkiye

10/06/2013-28/06/2013 Laboratuvar stajyeri
İZÜ, İstanbul, Türkiye

Eğitim ve Öğretim

04/01/2017-devam ediyor	Yüksek Lisans (% 100 Rektörlük bursu) İZÜ/Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği
09/2012-07/2016	Lisans (% 100 ÖSYM bursu) İZÜ/Mühendislik ve Dođa Bilimleri Fakóltesi, Gıda Mühendisliği
09/2007-06/2011	Lise Zeytinburnu Borsa Anadolu Lisesi, Fen Bilimleri

Projeler

"Probiyotik Kóltureler Kullanılarak Fındık Sütünden Yođurt Elde Edilebilirliđinin Araştırılması"
TÜBİTAK 2241-A Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı
(Mart-Haziran 2016)

Yayınlar

Ermiş, İ. vd. (2018). Characterization of Hazelnut Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii supss. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *The Journal of Food*, 43(4): 677-686.

Ermiş, İ., Güneş, R. ve Zent, İ. (2018). Bazı Model Toz Gıdaların Akışkanlığına ve Sıkıştırılabilirliğine Partiköl Boyutunun Etkisinin PFT Toz Akışı Test Cihazı Kullanılarak Belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1): 55-60.

Sertifikalar

Temel Gıda Hijyeni Eğitimi, İZUSEM (2016)
EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, İZUSEM (2016)
TS EN ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemleri, İZUSEM (2016)
İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, İZUSEM (2016)
Yaratıcı Drama, İSMEK (2019)

Kişisel Beceriler

Yabancı Dil
İngilizce (orta düzey)

Bilgisayar Bilgisi
İleri Ofis Programları