

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

İÇ AY ÇEKİRDEĞİ VE PEYNİR ALTI SUYU
PROTEİNLERİNDEN ÜRETİLEN PEPTİTLERİN BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE BAZI GIDA
ÜRÜNLERİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sena Nur DUMAN

İstanbul
Ekim, 2024

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

İÇ AY ÇEKİRDEĞİ VE PEYNİR ALTI SUYU
PROTEİNLERİNDEN ÜRETİLEN PEPTİTLERİN BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE BAZI GIDA
ÜRÜNLERİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sena Nur DUMAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

İstanbul
Ekim, 2024

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

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

Danışman Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Doç. Dr. Banu METİN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**İç Ay Çekirdeği ve Peynir Altı Suyu Proteinlerinden Üretilen Peptitlerin Biyoaktif Özelliklerinin İncelenmesi ve Bazı Gıda Ürünlerinde Kullanımı**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakça da gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Sena Nur DUMAN

ÖN SÖZ

Çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren kıymetli danışman hocam Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e, laboratuvarında bilgi, birikim ve çalışmalarıyla destek olan Biyokimyager Bilal ÇAKIR'a, laboratuvarında edindiğim tecrübeye büyük katkısı olan Ar. Gör. Zeynep Saliha GÜNEŞ'e, finansal desteğiyle TÜBİTAK 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 122O171 numaralı proje kapsamında bu çalışmaya katkıda bulunan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na ve eğitim hayatım boyunca destekleriyle her zaman yanımda olan aileme minnet ve saygılarımı sunarım.

Sena Nur DUMAN
İstanbul, 2024

ÖZET

İÇ AY ÇEKİRDEĞİ VE PEYNİR ALTI SUYU PROTEİNLERİNDEN ÜRETİLEN PEPTİTLERİN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE BAZI GIDA ÜRÜNLERİNDE KULLANIMI

Sena Nur DUMAN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Ekim, 2024, 82 Sayfa

Bu tezin konusu, iç ay çekirdeği ve peynir altı suyu (PAS) proteinlerinden elde edilen protein hidrolizatlarının biyoaktivitesini ve gıda ürünlerinde kullanım potansiyelini incelemektir. Bu çalışmada günlük diyetle yer alan ya da alabilecek gıdaların, biyoaktif peptit içeren hidrolizatların zenginleştirilip ürünlerin biyoaktivitesinin artırılması amaçlanmıştır. Bu şekilde günlük olarak tüketilen gıdaların daha sağlıklı ve biyoetkili versiyonlarının elde edilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca iç ay çekirdeği ve peynir altı suyundan derivate edilmiş peptitlerin benzer durumlarda biyoaktivite bakımından etkileri incelenerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. İç ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu izoelektrik çöktürme-alkali izolasyon (AE-IP) yöntemiyle elde edilip uygun proteoliz ve ultrafiltrasyon teknikleri ile fraksiyonlara ayrılmış, peptit dispersiyonlarına ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) önleyici ve DPP-IV (dipeptidil peptidaz - 4) önleyici aktivite testleri uygulanmıştır. Hidrolizat ve fraksiyonların protein ve hidroliz dereceleri belirlenerek ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizatlarının 10 kDa permeat fraksiyonu, analizlere yüksek değer göstererek belirlenmiş ve gıda örneklerine uygulamak üzere hazırlanmıştır. Elde edilen biyoaktif peptit içeren protein hidrolizatları farklı depolama sürelerine sahip 3 gıda ürününe (makarna, puding ve dondurma) eklenmiştir. Gıda ürünlerinden depolama süresinde belirli aralıklarla numune alınmıştır. Toplanan numunelere ACE önleyici ve DPP-IV önleyici aktivite testleri uygulanmıştır. İnsan vücuduna etkisini

incelemek amacıyla sindirim simülasyonu yapılmıştır. Biyoaktivite testleri sonucunda ay çekirdeği, kaşar ve beyaz PAS fraksiyonu ACE inhibisyon değerleri sırasıyla %96.3, %98.2 ve %100.0, DPP-IV inhibisyon değerleri ise sırasıyla %70.6, %71.1 ve %72.6 olarak bulunmuştur. Gıda örnekleri depolama numunelerinin biyoaktivite analizlerinde ise puding örneğinde ay çekirdeği hidrolizat eklenen numuneler diğerlerine nazaran daha yüksek inhibisyon değerleri göstermiştir. Dondurma depolama numunelerinde ise kontrol dondurma en yüksek inhibisyon değerleri bulunmuştur. Makarnada %5 kaşar ve beyaz hidrolizat eklenen numuneler %32.8-47.1 aralığında ACE inhibisyonu göstermiştir. Yapılan LC-MS/MS analizleri sonucunda ay çekirdeği fraksiyonunda inhibitör peptitler olarak B1, SFA8 ve G3 proteinlerin sekansları bulunmuştur. Beyaz ve kaşar PAS fraksiyonlarında α -laktalbumin, albümin ve β -laktoglobulin peptitlerinin sekansları tespit edilmiştir. Gıda örneklerine eklenen ay çekirdeği keki ile beyaz ve kaşar PAS biyoaktif peptitler içermesi ile gıda endüstrisinde önemli bir kaynak olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Protein, Fraksiyonlama, Fonksiyonel Gıdalar, Biyoaktivite.

ABSTRACT
INVESTIGATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF
PEPTIDES PRODUCED FROM SUNFLOWER SEED AND
WHEY PROTEINS AND THEIR USE IN SOME FOOD
PRODUCTS

Sena Nur DUMAN

Master, Food Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Prof. İbrahim GÜLSEREN

October, 2024, 82 Pages

The subject of this thesis is to examine the bioactivity of protein hydrolysates obtained from sunflower seeds and whey proteins and their potential for use in food products. In this study, it was aimed to enrich the foods that are or can be included in the daily diet and the hydrolysates containing bioactive peptides and to increase the bioactivity of the products. In this way, it is aimed to obtain healthier and bioeffective versions of daily consumed foods. Additionally, the effects of peptides derived from sunflower seeds and whey in terms of bioactivity in similar situations were examined and the results were compared. Sunflower seeds, cheddar and white whey were obtained by the isoelectric precipitation-alkali isolation (AE-IP) method and fractionated with appropriate proteolysis and ultrafiltration techniques. ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitor and DPP-IV (dipeptidyl peptidase - 4) inhibitor activity tests were applied. By determining the protein and hydrolysis degrees of the hydrolyzates and fractions, the 10 kDa permeate fraction of sunflower seed, cheddar and white whey hydrolysates was determined to show high value in the analyzes and was prepared to be applied to food samples. The resulting protein hydrolysates containing bioactive peptides were added to 3 food products (pasta, pudding and ice cream) with different storage times. Samples were taken from food products at regular intervals during storage. ACE inhibitory and DPP-IV inhibitory activity tests were applied to the collected samples. A digestion simulation was done to examine its effect on the human body. As a result of bioactivity tests, ACE inhibition values of sunflower seeds, cheddar and white whey fractions were found to be 96.3%, 98.2% and 100.0%, respectively, and DPP-IV inhibition values were

70.6%, 71.1% and 72.6%, respectively. In the bioactivity analysis of food storage samples, samples with sunflower seed hydrolyzate added to the pudding sample showed higher inhibition values than others. In ice cream storage samples, the highest inhibition values were found in control ice cream. Samples with 5% cheddar and white hydrolyzate added to pasta showed ACE inhibition in the range of 32.8-47.1%. As a result of LC-MS/MS analysis, sequences of B1, SFA8 and G3 proteins were found as inhibitor peptides in the sunflower seed fraction. Sequences of α -lactalbumin, albumin and β -lactoglobulin peptides were determined in white and kashar whey fractions. Sunflower seed cake and white and cheddar whey added to food samples have shown to be an important source in the food industry as they contain bioactive peptides.

Key Words: Protein, Fractionation, Functional Foods, Bioactivity.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	ii
ÖN SÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xi
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	
LİTERATÜR BİLGİSİ	4
2.1. Endüstriyel ile tarımsal yan ürünler ve atıklar	4
2.2. Peynir altı suyunun eldesi ve değerlendirilmesi	5
2.3. Ay çekirdeği küspesinin eldesi ve değerlendirilmesi	9
2.4. Bitkisel ve hayvansal proteinler	12
2.5. Biyoaktif peptitler	12
2.6. Fraksiyonlama	13
2.6.1. Enzimatik hidroliz	14
2.6.2. Membran filtrasyonu	15

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.2. Proteinlerin izolasyonu	17
3.3. Protein izolatlarının proteolizi	18
3.4. Proteolitik hidrolizatların UF bazlı fraksiyonlanması	18
3.5. Hidrolizatların hidroliz derecesinin belirlenmesi	19
3.6. Biyoaktivite testleri.....	20
3.6.1. ACE-önleyici aktivite testleri	20
3.6.2. DPP-IV önleyici aktivite testleri.....	21
3.7. Biyoaktif peptit fraksiyonlarının ürün geliştirme denemelerinde değerlendirilmesi ve depolama testleri	22
3.9. Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim analizleri.....	23
3.10. LC-MS/MS analizleri	25

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Protein tayini.....	27
4.2. Hidroliz derecesinin belirlenmesi	29
4.3. Biyoaktivite testleri.....	35
4.3.1. ACE önleyici aktivite testleri	35
4.3.2. DPP-IV önleyici aktivite testleri.....	37
4.4. Biyoaktif peptit fraksiyonlarının ürün geliştirme denemelerinde değerlendirilmesi ve depolama testleri	38
4.5. Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim analizleri.....	47
4.6. LC-MS/MS sonuçları.....	49

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER	53
--------------------------------	-----------

KAYNAKÇA	55
-----------------------	-----------

EKLER	62
--------------------	-----------



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Çeşitli peynir altı suyu proteinlerinin içerikleri	5
Tablo 2.2: Peynir altı suyunun protein içeriği	7
Tablo 2.3: Tatlı çedar, ekşi peynir altı suyu ve ultrafiltrasyon permeat çedar içerikleri	9
Tablo 2.4: Ay çekirdeği yağı ve küspesinin yıllara göre global üretim, ithalat ve ihracatı	10
Tablo 4.1: Protein örneklerinin içeriği (%).....	29
Tablo 4.2: Hidrolizat ve fraksiyonların hidroliz dereceleri (%)	34
Tablo 4.3: Hidrolizat örneklerinin ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)	36
Tablo 4.4: Hidrolizat örneklerinin DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri (%)	37
Tablo 4.5: Kontrol ve ay çekirdeği protein hidrolizati eklenmiş gıda örneklerinin DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri (%).....	44
Tablo 4.6: Puding örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)	45
Tablo 4.7: Dondurma örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)	46
Tablo 4.8: Makarna örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)	46
Tablo 4.9: Ay çekirdeği hidrolizati 10 kDa permeat fraksiyonu (%5) eklenen dondurma örneği LC-MS/MS analizi	50
Tablo 4.10: Kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizati 10 kDa permeatı (%5) eklenen dondurma örneği LC-MS/MS analizi.....	51
Tablo 4.11: Ay Çekirdeği Protein Fraksiyonlarında Potansiyel ACE İnhibe Edici Peptitlerin <i>In Silico</i> Karakterizasyonu	52
Tablo 4.12: Ay Çekirdeği Protein Fraksiyonlarında Potansiyel DPP-IV İnhibe Edici Peptitlerin <i>In Silico</i> Karakterizasyonu	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Peynir altı suyundan biyoaktif peptit üretimi	8
Şekil 2.2: Ay çekirdeği yağı üretimi.....	10
Şekil 2.3: Ülkelere göre Dünya genelinde ay çekirdeği üretim kapasiteleri	11
Şekil 2.4: Hipertansiyonun gelişiminde ACE ve ACE-önleyici peptitlerin etki mekanizmaları.....	13
Şekil 3.1: Ay çekirdeği ve peynir altı suyu hidrolizatlarının 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek fraksiyonlanması.....	19
Şekil 3.2: Sindirim simülasyonu.....	24
Şekil 4.1: AE-IP yöntemi ile ay çekirdeği protein izolatu eldesi	27
Şekil 4.2: Kjeldahl metodu protein tayininde distilasyon cihazı ve titrasyon öncesi ve sonrası renk değişimi gözlenen örnekler.....	28
Şekil 4.3: Alcalase ve Flavourzyme uygulanan sırasıyla beyaz ile kaşar peynir altı suyu hidrolizat ve ay çekirdeği protein hidrolizatları örnekleri.....	31
Şekil 4.4: Absorbansı 340 nm dalga boyunda ölçülen hidroliz derecesi belirleme analiz APH örnekleri	32
Şekil 4.5: Sırasıyla kaşar peynir altı suyu, ay çekirdeği ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (TNBS) analizi	32
Şekil 4.6: Sırasıyla kör, kaşar PAS 10 kDa permeat, 3 kDa retentat ve permeat örneklerinin hidroliz derecesi (TNBS) analizi.....	33
Şekil 4.7: Makarna yapma makinesinde spagetti türü makarna yapımı denemesi ..	38
Şekil 4.8: Makarna örneklerinin kurutulması	39
Şekil 4.9: Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%2 veya 5) makarna örnekleri.....	39
Şekil 4.10: Pişirme işlemi uygulanmakta olan kontrol makarna örnekleri.....	40
Şekil 4.11: Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%2 veya 5) puding yapım aşaması ve örnekleri.....	40
Şekil 4.12: İki farklı formülasyon uygulanmış ve liyofilize APH eklenmiş (%0-2) pudingleri	41
Şekil 4.13: Kaşar peynir altı suyu hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%0-5) puding örnekleri.....	41
Şekil 4.14: Dondurma makinesinde hazırlanan kontrol dondurma örneği	42

Şekil 4.15: ACE biyoaktivite analizi için hazırlanmış yoğurt, dondurma ve puding HPLC örnekleri.....	44
Şekil 4.16: Ay çekirdeği protein Alcalase hidrolizat <i>in vitro</i> sindirim simülasyonu	47
Şekil 4.17: Ay çekirdeği protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%0-5) dondurma ve puding <i>in vitro</i> sindirim simülasyonu	48
Şekil 4.18: Sindirimi tamamlanmış santrifüj sonrası faz ayrımı görülen ay çekirdeği protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%0-5) dondurma örnekleri	48
Şekil 4.19: Simüle edilmiş sindirim prosesleri tamamlanmış kontrol ve hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş makarna ve dondurma örnekleri	49

KISALTMALAR LİSTESİ

m	: Mili
μ	: Mikro
n	: Nano
k	: Kilo
g	: Gram
l	: Litre
Da	: Dalton
M	: Molar
N	: Normal
U	: Ünite
AU	: Alcalase Ünitesi
ppm	: Milyonda Bir Birim (Parts Per Million)
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
xg	: Yerçekimi İvmesi
pH	: Hidrojen İyonu Gücü (Power of Hydrogen)
Abs	: Absorbans
AE-IP	: Alkali Ekstraksiyonu – İzoelektrik Çöktürme (Alkali Extraction – Isoelectric Precipitation)
APK	: Ayçekirdeği Proteini Keki
API	: Ayçekirdeği Protein izolatı
PAS	: Peynir Altı Suyu
APH	: Ay çekirdeği Protein Hidrolizatı
KPH	: Kaşar Peynir Altı Suyu Hidrolizatı
BPH	: Beyaz Peynir Altı Suyu Hidrolizatı
DH	: Hidroliz Derecesi (Degree of Hydrolysis)
TNBS	: 2,4,6-Trinitrobenzenesülfonik Asit
ACE	: Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim (Angiotensin-Converting Enzyme)
DPP-IV	: Dipeptidil Peptidaz-4
TPC	: Toplam Fenolik İçerik (Total Phenolic Content)
DPPH	: Antioksidan Aktivitesi (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
GAE	: Gallik Asit Eşdeğerliği
TE	: Troloks Eşdeğeri
NCD	: Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar (Non-Communicable Diseases)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Ziraat Dairesi (United States Department of Agriculture)

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Biyoaktif bileşenlere sahip bitkisel ve hayvansal protein hidrolizatları, tüketim ve sağlıklı beslenme açısından olumlu potansiyellere sahiptir. Sağlıklı bir insanda günlük protein alımı 2 g/kg vücut ağırlığı şeklinde önerilmektedir (Wu, 2016). Bu oranın sağlanamaması durumunda oluşabilecek hastalıkların önlenmesinde gıdaların besin içeriği ön plana çıkmaktadır. Türkiye’de 2022 yılında gerçekleşen ölümlerin %90’ına, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıkları da kapsayan bulaşıcı olmayan hastalıkların (NCD: ‘non-communicable diseases’) neden olduğu saptanmıştır (WHO, 2022). Hipertansiyon, diyabet, obezite, iltihaplı hastalıklar ve bakteriyel enfeksiyon gibi kronik hastalıkların önlenmesi ve bunlarla baş edilmesinde gıda kaynaklı biyoaktif peptitler, sağlığa yararlı ajanlar olarak son 20 yılda bu alanda kullanılmaya başlanmıştır (Jia vd., 2021). Bu kapsamda günlük diyetlerde yer alan gıdaların besin içeriğinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesinin gerçekçi bir pozitif etki oluşturabileceği gözlemlenmektedir.

Bitkisel sıvı yağ endüstrisinde yüksek miktarda yağsız yerkıstığı küspesi, iç ay çekirdeği keki ve kolza tohumu küspesi tozu meydana gelmekte olup (Tu vd., 2023) bu maddelerin değerlendirilmesi alanındaki yaklaşımlar da son dönemde önem kazanmaktadır. Ay çekirdeği kompozisyonu %43.5 yağ, %16.5 lif, %15.5 yağ ana bileşenlerinden oluşmaktadır (Clef & Kemper, 2015). İç ay çekirdeği kekinin yağ sanayinde besin içeriği yüksek bir yan ürün olması dolayısıyla bu maddeye değer kazandırılması hem üretici hem tüketici için fayda sağlama potansiyeli taşımaktadır.

Hayvansal kaynaklı bir gıda olan peynir altı suyu (PAS), içerik açısından zengin bir yan ürün olmakla beraber, ekonomik olması sebebiyle fonksiyonel gıda ve takviyelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Peynir altı suyu, yüksek biyoaktivite özellik gösteren proteinler ve aminoasitler içermektedir (Güzeler vd., 2017). Türkiye’de 2019 yılında yaklaşık 781 bin ton PAS ve 32 bin ton PAS tozu üretilmiştir (TÜİK, 2019). Endüstriyel uygulamalar için de yan ürün olarak değerlendirilip israf azaltılabilmektedir.

Belirli koşullarda uygulanan enzimatik hidroliz yöntemi ile mikrobiyal fermantasyonun biyoaktif peptitlerin üretiminde daha çok tercih edilmesinin sebepleri; kısa reaksiyon süresi, ölçeklenebilirlik ve öngörülebilirliğe sahip olmasıdır (Daliri vd., 2017). Bu nedenle laboratuvarlarda protein izolasyon ve eldesi uygulamalarında ulaşılabilir yöntem olarak kullanılabilir.

Peptitlerin eldesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Kromatografi, membran filtrasyonu, çökeltme-kümeleşme ve enzimatik hidroliz metotları, yük, çözünürlük ve moleköl büyüklüğü gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere göre fraksiyonlama uygulamalarına örnektir (Chen vd., 2023). Örneğin, gıda kaynaklı antihipertansif peptitlerin *in vivo* analizlerinde gözlemlendiği üzere yüksek doku afinitesine sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle sentetik ilaçlara nazaran dokulardan daha yavaş elimine olabilmektedir (Koyama vd., 2014).

Fonksiyonel gıdaların diyetlerde yer almasının sağlık açısından önemli olduğu görölmektedir. Ayrıca gıdalara eklenen fonksiyonel bileşenlerin raf ömrünün ve koşullarında fiziksel veya kimyasal değişime uğrama tehlikesi bulunmaktadır. Raf ömrü boyunca alınan numuneler analiz edilerek ortaya çıkabilecek değişimlerin gözlemlenmesi biyoaktif maddeler hakkında daha fazla bilgi sunma potansiyeline sahiptir.

Peptitlerin antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antihipertansif, antimikrobiyal ve obeziteyi önleyen özellikleri bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda diyabet hastalığına karşı inhibisyon özelliği gösteren bitkisel peptitlerin α -amilaz, dipeptidil peptidaz IV, glikoz taşıyıcı sistem ve insülin aktiviteyi taklit eden sistemler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Patil vd., 2020). Hipertansiyon hastalığında anjiyotensin dönüştürücü enzim, kan basıncının düzenlenmesi ve düşürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda ACE inhibitörlerinin kalp hastalıkları ve bu hastalıklara bağlı gelişen ölüm olaylarında önemli derecede etkisinin olduğu görölmüştür (Akbarian vd., 2022).

Ağız yoluyla vücuda giren biyoaktif peptitlerin vücuda faydalı olabilmeleri amacıyla mide ve bağırsak sindiriminden geçip kana karışmaları ve daha sonra organlara ulaşmaları gerekmektedir (Maestri vd., 2019). Bu nedenle sindirim simülasyonu

uygulamasý sonrasında biyoaktivitede oluřan deęiřimlerin analiz edilmesi 6nem tařımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, i ay çekirdeği ve peynir altı suyundan proteinlerinden elde edilen peptitlerin biyoaktivitesinin ve gıda 6r6nlerinde kullanım potansiyelinin incelenmesidir.



İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu tez kapsamında ay çekirdeği ve peynir altı suyundan elde edilen proteolitik protein hidrolizatlarının biyoaktivitesi ve gıda ürünlerinde kullanım potansiyeli incelenmiştir. Buna paralel olarak protein hidrolizatları üretilmiş ve bunların biyoaktif özellikleri değerlendirilmiştir. Depolama ve sindirim süresince meydana gelebilecek değişiklikler ele alınıp değerlendirilmiştir. Endüstriyel uygulamalar ve laboratuvar çalışmaları ilgili araştırmalarla açıklanmıştır.

2.1. Endüstriyel ile Tarımsal Yan Ürünler ve Atıklar

Besinsel değerleri artırılmış fonksiyonel gıdalarda yan ürünlerin kullanımı, zengin içeriklerin geri kazandırılması ve israfın önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) tarafından yapılan bir araştırmada dünyada üretilen gıdaların üçte birinin israf edildiği görülmüştür (Cederberg & Sonesson, 2011). Yan ürünler harman sonrası üretimde ve depolama sırasında oluşmaktadır. Genellikle yüksek lifli yan ürünler yem endüstrisinde kullanılmaktadır. Yüksek lif, polifenol değerleri ve antioksidan özellik içeren tarımsal yan ürünler, gıda endüstrisinde kullanım açısından önemli bir potansiyele sahiptir.

Dünyada yağlı tohumların üretimi 2018 yılında yaklaşık 600 milyon ton olarak gerçekleşirken bu miktarın önemli bir bölümü yağ ekstraksiyonu için kullanılmaktadır (Karefyllakis vd., 2019). Bitkisel sıvı yağ endüstrisinde yüksek miktarda yağsız yerfıstığı küspesi, iç ay çekirdeği keki ve kolza tohumu küspesi tozları meydana gelmekte olup (Tu vd., 2023), bu maddelerin değerlendirilmesi alanındaki yaklaşımlar da önem kazanmaktadır.

Peynir altı suyu endüstriyel anlamda yan ürün olarak peynir yapımında ortaya çıkmaktadır. Laktoz, protein ve yağ açısından zengin olmakla beraber %99 oranında biodegrade bir organik maddedir (Bacenetti vd., 2018). Yeni tekniklerle konsantre edilerek yüksek besin içerikli ürünler elde edilmektedir. Gıda endüstrisinde yoğurt, şekerleme, çikolata, dondurma gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

2.2. Peynir Altı Suyunun Eldesi ve Değerlendirilmesi

Sütün pıhtılaştırılmasıyla peynir elde edilmektedir. Pıhtılaştırma işleminde rennet ve şirden gibi hayvansal pıhtılaştırıcılar, incir ve altın çilek gibi bitkisel pıhtılaştırıcılar, mikrobiyal ile kimyasal pıhtılaştırıcılar kullanılmaktadır. Peynir yapımında oluşan pıhtının ayrılması sonucu kalan sütün sarı-yeşil sulu kısmı, peynir altı suyudur (Zandona vd., 2021). Peynir altı suyu, %95 su, %5 kuru maddeden oluşan bir yan üründür. Kuru maddede laktoz, peynir altı suyu proteinleri, laktik asit, kül ve yağ bulunmaktadır. Toplam protein miktarı %0.8 veya 1 civarındadır (Tsakali vd., 2010). Peynir altı suyunun içeriği üretilen peynire göre değişmektedir. İneğin türü ve sağlık durumu, sezon ve lokasyon peynir altı suyunu etkileyen faktörlerdir (Durham & Hourigan, 2007).

Sütteki majör proteinler, kazeinler ve peynir altı suyu proteinleri olarak sınıflandırılabilir. pH 4.6'da sırasıyla sütte çözünmeyen ve çözünür formda bulunmaktadır. Peynir altı suyu içeriğindeki en önemli proteinler olan β laktoglobulin, α -laktalbumin, albümin, immünoglobulin ve laktoferrin önemli düzeyde fonksiyonel ve nutrasötik özelliklere sahiptir (Ghosh vd., 2017). Tablo 2.1'de peynir altı suyu tozu, konsantre ve izolat peynir altı suyu protein içerikleri verilmektedir. Protein miktarı en yüksek izolatta, laktoz miktarı peynir altı suyu tozunda ve süt yağı ise konsantrede bulunmaktadır.

Tablo 2.1: Çeşitli peynir altı suyu proteinlerinin içerikleri

İçerik	Peynir altı suyu tozu	Konsantre	İzolat
Protein (%)	11-14.5	25-89	<90
Laktoz (%)	63-75	10-55	0.5
Süt yağı (%)	1-1.5	2-10	0.5

Kaynak: Hayes & Cribb, (2008) kaynağından adapte edilmiştir.

Peynir altı suyu zengin bir yan ürün olmakla beraber maliyetinin uygun olması nedeniyle fonksiyonel gıda ve takviyelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Peynir altı suyu tozu süt ürünlerinde, şekerlemelerde ve pastacılık ürünleri gibi çeşitli gıda alanlarında kullanılmaktadır. Gıdalara hem besin içeriği hem de duyu özelliklerini geliştirmek için eklenmektedir. Peynir altı suyu konsantresinde ise su, mineraller ve laktoz kısmen uzaklaştırılmıştır. Peynir altı suyu, biyoaktivitesi yüksek proteinler ve amino asitler içermektedir (Güzeler vd., 2017). Peynir altı suyu izolatında laktoz ve yağ uzaklaştırılır. Yüksek miktarda protein içermektedir. Sporcuların beslenmesinde kas oluşumunu olumlu yönde etkilemektedir. Türkiye’de 2019 yılında yaklaşık 781 bin ton PAS ve 32 bin ton PAS tozu üretilmiştir (TÜİK, 2019). Dünya genelinde PAS ticari üretimi 10 milyar doları aşmaktadır. Kuzey Amerika yaklaşık 4 milyar dolar üretim ile ilk sırada yer alırken, Avrupa ve Asya bölgeleri ardında yer almaktadır (Mukherjee vd., 2023).

Tablo 2.2’de peynir altı suyunda bulunan β -laktoglobulin, α -laktalbumin, glikomakropeptit, immunoglobulin, serum albümin, laktoferrin ve laktoperoksidaz proteinlerinin konsantrasyonları, molekül ağırlıkları ve amino asit kalıntı sayısı verilmektedir. Peynir altı suyunda en yüksek konsantrasyona sahip β -laktoglobulin ve α -laktalbumin bileşenlerinin molekül ağırlığının 10 kDa üzerinde olduğu gözlemlenmektedir. Bu durumda, PAS glikomakropeptit dışındaki proteinlerin 10 kDa membrana sahip ultrafiltrasyon membranından geçirilmesi sonucunda elde edilen PAS konsantrelerinde yüksek amino asit miktarının bulunduğu söylenebilir. Yapılan bir çalışmada beyaz ve kaşar peynirlerin kimyasal özelliklerinde suda eriyen azot oranı ve oligonlukları dışında farklılık bulunmadığı görülmüştür (Çakmakçı vd., 2017).

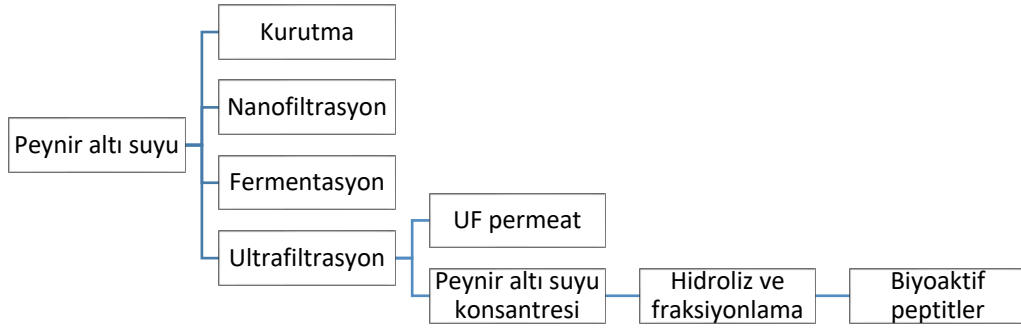
Peynir altı suyu proteinlerinin yüksek besin değeri, içerisindeki esansiyel amino asitlerinin fazla miktarda sülfür içermesinden kaynaklanmaktadır (Soltani vd., 2017). Zincirli esansiyel amino asitlerden lösin, isolösin ve valinin insan vücudunda metabolizma ve kan glikozunun hemostazında önemli rol oynadığı görülmüştür (Patel, 2015).

Tablo 2.2: Peynir altı suyu protein içeriği

Bileşenler	Konsantrasyon (g/L)	Molekül ağırlığı (Da)	Aminoasit kalıntı sayısı
β – Laktoglobulin	1.3	18277	162
α – laktalbumin	1.2	12175	123
Glikomakropeptit	1.2	6700	64
İmmunoglobulin	0.7	25000-70000	-
Serum albumin	0.4	66267	582
Laktoferrin	0.1	80000	700
Laktoperoksidaz	0.03	70000	612

Kaynak: Madureira vd., (2007)

Peynir altı suyundan belirli yöntemlerle çeşitli ürünler elde edilmektedir. Peynir altı suyu konsantre ve tozu, laktoz, yağ ve protein eldesinde endüstri açısından besin değeri yüksek ürünler üretilebilmektedir. Şekil 2.1’de peynir altı suyundan biyoaktif peptit üretim akış şeması gösterilmektedir. Peynir altı suyu kurutma, nanofiltrasyon, fermentasyon ve ultrafiltrasyon gibi yöntemler, daha önce bahsedilen ürünlerin eldesinde endüstride yaygın kullanılan yöntemlerdir. Peynir altı suyundan ultrafiltrasyon uygulaması sonrasında permeat ve peynir altı suyu konsantresi elde edilmektedir. Peynir altı suyu konsantresi, hidroliz ve fraksiyonlama işlemleri ardından farklı molekül ağırlığındaki biyoaktif peptitler meydana gelir.



Şekil 2.1: Peynir altı suyundan biyoaktif peptit üretimi

Kaynak: Durham & Hourigan, (2007)

Hayvansal kaynaklı rennet enzimi kullanılarak çedar, kaşar ve mozzarella gibi peynir yapımı sonrasında elde edilen tatlı peynir altı suyunun pH seviyesi 5.6'dan yüksektir. Ekşi peynir altı suyunun pH seviyesi 5.1'den küçüktür. Beyaz ve krem gibi taze peynirlerin üretiminde laktik asit fermentasyonu ile elde edilir. Ekşi peynir altı suyu hidroklorik asit ile kazein üretiminden de elde edilmektedir. Ekşi peynir altı suyu tatlı peynir altı suyuna oranla daha yüksek kalsiyum fosfat içermektedir (Durham & Hourigan, 2007). Tablo 2.3'te çedar ve ekşi peynir altı suyu ile ultrafiltrasyon permeat içeriği verilmiştir. Çedar tatlı peynir altı suyu ve UF permeatın pH değerleri 5.6'dan yüksek olarak gözlemlenmektedir. Protein açısından en yüksek değer çedar tatlı peynir altı suyunda görülmektedir. HCl ve laktik asit kullanılan ekşi peynir altı sularında ise laktoz ve protein diğerlerine göre daha düşük olmaktadır. Protein değerleri bakımından gıda ürünlerine tatlı peynir altı suyunun eklenmesi, daha yüksek proteinli ürün eldesi için ideal görülebilir.

Tablo 2.3: Tatlı çedar, ekşi peynir altı suyu ve ultrafiltrasyon permeat çedar içerikleri

İçerik	Tatlı peynir altı suyu		Ekşi peynir altı suyu		UF permeat
	Çedar	HCl	Laktik	Çedar	
Kuru madde (%)	6.6	5.1	6.0	5.5	
pH	6.1	4.7	4.0	6.1	
Laktoz (%)	4.8	3.7	3.9	4.7	
Protein (%)	0.9	0.73	0.72	0.01	
Kül (%)	0.59	0.60	0.72	0.53	
Laktik asit (%)	0.13	0	0.60	0	
Yağ (%)	0.06	0.05	0.003	0	
Kalsiyum (ppm)	430	1200	1140	375	
Fosfor (ppm)	440	680	900	275	
Postasyum (ppm)	1460	1200	1530	1450	
Sodyum (ppm)	430	270	400	430	
Klor (ppm)	970	2600	910	940	

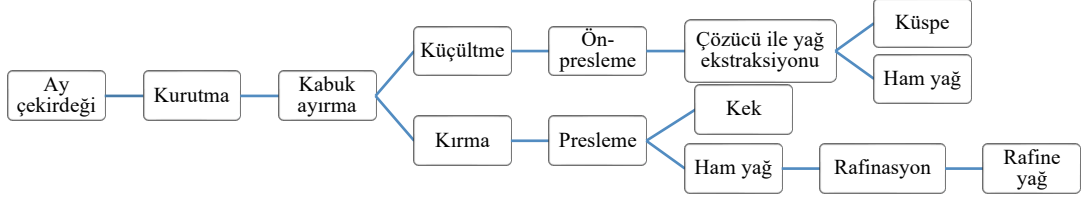
UF: Ultra filtrasyon; ppm: milyonda bir birim.

Kaynak: Durham & Hourigan, (2007)

2.3. Ay Çekirdeği Küspesi Eldesi ve Değerlendirilmesi

Ayçiçek yağı üretiminde, hayvan ve insan tüketiminde ve biyodizel eldesinde kullanılmaktadır. Ay çekirdeğinin bileşimi %43.5 yağ, %16.5 lif, %15.5 yağ ve mineral gibi bileşenlerden oluşmaktadır (Clef & Kemper, 2015).

Ay çekirdeği, yağ içeriği bakımından zengin ve yağının zeytinyağı gibi yağlara oranla daha az maliyetli olması bakımından hem üretici hem tüketici açısından oldukça tercih edilmekte olan bir üründür. Yağ üretiminde hammadde, rafine yağ elde edilene kadar birçok işlemden geçirilmektedir. Ay çekirdeği yağı üretimi akım şemasında (Şekil 2.2) görüldüğü üzere ay çekirdeği hammaddesi önce kurutulduktan sonra kabuk ayırma işleminden geçirilerek iç ay çekirdeğinin eldesi sağlanır. Kırma, küçültme ve presleme işlemlerinden sonra kimyasal çözücü ile muamele edildiğinde küspe ve ham yağ elde edilmektedir. Soğuk presleme ile kimyasal kullanılmadan sadece presleme sonrasında kek ve ham yağ elde edilir. Soğuk pres yağlar rafinasyon sonrası rafine yağ haline getirilerek raf ömrü uzatılmış tüketilmeye hazır yağlar haline gelmektedir. Küspe ve soğuk pres kek ise yan ürün olarak yem sanayinde kullanılabilir.



Şekil 2.2: Ay çekirdeği yağı üretimi

Kaynak: Hadidi vd., (2024)

Ayçiçek yağı Türkiye’de ve Dünya’da en yaygın kullanılan yağlardan birisidir. Tablo 2.4’te 2019 - 2023 yılları arasında global ay çekirdeği, küspe ve yağının üretim ithalat ve ihracat miktarları verilmektedir. Yıllar içinde değerlerde lineer bir artış olmamakla beraber, stabil bir piyasanın varlığından söz edilebilir. Ay çekirdeği küspesi üretiminde ise 2019’dan 2023’e kadar yaklaşık olarak %3.7 artış gözlenmektedir.

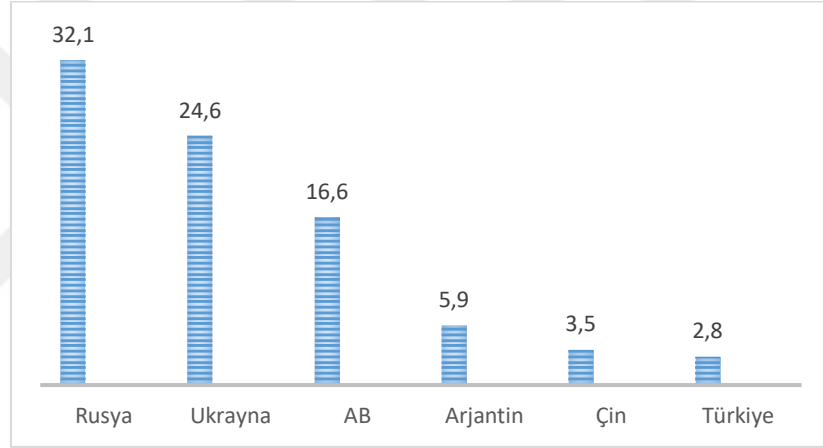
Tablo 2.4: Ay çekirdeği yağı ve küspesinin yıllara göre global üretim, ithalat ve ihracatı

		2019	2020	2021	2022	2023
Üretim (milyon ton)	Ay çekirdeği	54.27	49.13	56.95	51.66	54.32
	Ay çekirdeği küspesi	21.75	20.25	21.24	22.50	22.55
	Ay çekirdeği yağı	21.13	19.02	19.71	20.93	20.93
İthalat (milyon ton)	Ay çekirdeği	3.34	2.74	3.79	4.78	3.33
	Ay çekirdeği küspesi	8.56	7.6	7.29	8.08	8.04
	Ay çekirdeği yağı	11.72	9.68	9.68	11.15	10.73
İhracat (milyon ton)	Ay çekirdeği	3.69	2.9	3.91	5.12	3.64
	Ay çekirdeği küspesi	8.84	8.13	7.77	8.63	8.48
	Ay çekirdeği yağı	13.47	11.33	11.08	12.66	12.18

Kaynak: USDA, (2023)

Şekil 2.3 Üzerinde Dünya genelinde ülkelerin ayçiçek üretimi gösterilmektedir. Ayçiçek üretiminde 2021 yılı için %32.1 ile Rusya ilk sırada bulunurken, Türkiye Dünyanın Ayçiçek ihtiyacının %2.8'ini karşılamaktadır. Yağ üretimi, ithalat ve ihracat açısından azımsanmayacak bir pazarının olduğunu göstermektedir.

Ayçiçeği üretimi 2023 yılında 2 milyon 198 bin ton olmakla beraber Türkiye’de üretilen tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretimi içerisinde pazar payının %2.8’ini oluşturmaktadır. Ayçiçeği üretiminin 2024 yılında 2 milyon 390 bin ton miktar ile bulunduğu pazar payının %3.1 kadarını oluşturması ve %8.7 kadar bir değişim göstermesi öngörülmektedir (TÜİK, 2023).



Şekil 2.3: Ülkelere göre Dünya genelinde ayçiçek üretim kapasiteleri

Kaynak: Bozer, (2021)

Türkiye'nin ayçiçek tohumu ihtiyacı ve arzı 2022 yılında sırasıyla 6.1 ve 3.1 milyon ton olarak saptanmıştır. Bu bakımdan %61 oranında dışarıya bağımlı olduğu görülmüştür. Araştırmada, 2021 ve 2022 yılında yağ üretimi amacıyla yetiştirilen 2.2 milyon ton ayçiçeği ile 856 bin ton ham ayçiçek yağı üretilerek, önceki yıla göre arz %18.5 artmıştır (Bozer, 2021). Bu konu ele alındığında ayçiçek yağı üretiminin yıllar içinde artması ile beraberinde yağ üretimi sırasında oluşan yan ürün miktarında yükselme olduğu da söylenebilir.

2.4. Bitkisel ve Hayvansal Proteinler

Gıdaların temel makromoleköl bileşenleri karbonhidrat, yağ ve proteinden oluşmaktadır. Protein ve amino asitler insan gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı bir insanda günlük protein alımı 2 g/kg vücut ağırlığı şeklinde önerilmektedir (Wu, 2016). Protein bakımından eksik beslenme sonucunda birçok hastalığın ortaya çıktığı bilinmektedir.

Son yıllarda bitkisel kaynaklı gıda tüketim alışkanlığı giderek artmaktadır. Etik, sağlık nedenler dolayısıyla artan bu yönelim, endüstriyel olarak da bitkisel kaynaklı gıda üretiminin artışına neden gösterilmektedir. Genel olarak bitkisel proteinlerde, dengesiz amino asit içeriğinin olması (lisin gibi esansiyel amino asitlerin eksikliği) ile daha düşük besin değeri içeriği olan daha yavaş ve az sindirilen proteinler ortaya çıkmaktadır (Day vd., 2022). Hayvansal proteinler yapıları gereği daha yüksek emülsifikasyon, stabilizasyon ve adsorpsiyon göstermesi ile gıdalarda oluşturduğu sinerjistik etkisi dolayısıyla bitkisel proteinlere oranla duyuşsal ve tekstürel özellikler daha üstün görülmüştür (Kim vd., 2020).

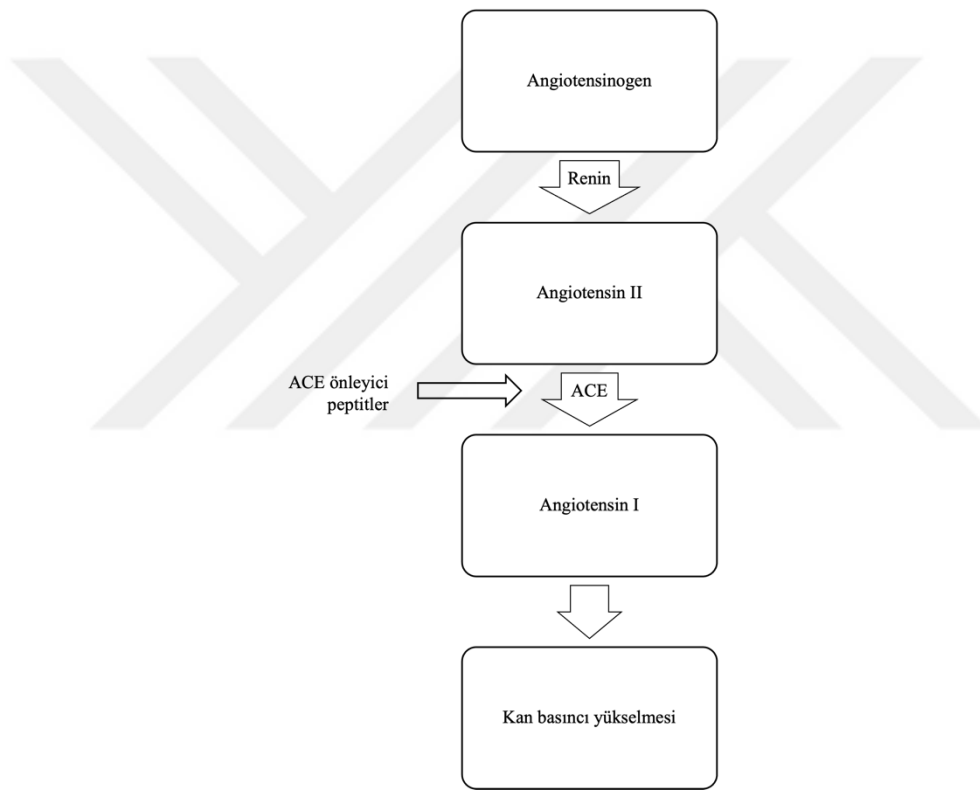
2.5. Biyoaktif Peptitler

Besinsel değerinin ötesinde, insan vücudunda olumlu etkileri olan peptitlere biyoaktif peptit denmektedir. Gıda işleme prosesleri, hidroliz ve sindirim gibi uygulamalarda inaktif durumdan aktif duruma geçebilmektedir. Biyoaktif peptitler genellikle molekül başına 2 - 20 aralığında amino asit kalıntısı içermektedir. Bazı durumlarda 20'den fazla amino asit de bulunabilmektedir (Contreras vd., 2011). Geçmişte yapılan çalışmalarda biyoaktif peptitlerin, antihipertansif, antioksidan, antitrombotik, antiobezite, antimikrobiyal, mineral bağlayıcı, opioid ve immünomodülatör etki gösterdikleri ortaya çıkmıştır (Ay ve Şanlı, 2018).

Kardiyovasküler hastalıklarının en önemli risk faktörlerinden biri yüksek tansiyondur. Kan basıncının dengelenmesinde ACE önemli rol oynamaktadır. Bu enzim, anjiyotensin I'nın anjiyotensin II'ya dönüşmesine neden olmaktadır. Anjiyotensin II'nın oluşmasıyla kan basıncı yükselerek hipertansiyon gerçekleşmektedir. Bunun

önlenmesinde ACE önleyici ajanlar büyük rol oynamaktadır. Şekil 2.4'te hipertansiyona neden olan anjiyotensin II'nin oluşumu ve biyoaktif peptitlerin inhibitör görevi gösterilmektedir.

Anjiyotensin II'nin oluşmasını ACE önleyici biyoaktif peptitler, süt ürünleri, balık, bitkisel ürünler, et ve yumurtada bulunmaktadır (Erdmann vd., 2008). Kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinde sırasıyla kazokinin ve laktokinin adıyla yüksek dozda ACE önleyici peptitler bulunmaktadır (Yamamoto, 1997).



Şekil 2.4: Hipertansiyonun gelişiminde ACE ve ACE-önleyici peptitlerin etki mekanizmaları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

İnsan sağlığını tehlikeye atan yaygın bir hastalık olan T2D diyabet, insülinde dengesizlik sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Uzun dönemde insan vücudundaki organları, sinir sistemini ve yaşam kalitesini önemli açıdan olumsuz etkilemektedir.

Japonya'da %95'ten fazla diyabet hastasının insüline bağı olmayan tip 2 diyabete sahip olduğu görülmüştür (Takahashi vd., 2021).

İlaç endüstrisinde DPP-IV inhibitörleri tip 2 diyabet ilacı olarak kullanılmaktadır (Takahashi vd., 2021). Bu inhibitörler, DPP-IV enzimlerinin inaktive ettiği kan glikozunun azalmasını uyaran hormon grubu GLP-1 ve GIP inkretinleri parçalayarak insülinin salgılanmasını sağlarken glikojen salgılanmasını da önleyerek insan vücudundaki kan şekerini düşürmektedir.

2.6. Fraksiyonlama

Proteinlerin fraksiyonlanması ve ayrıştırılması farklı karakteristik ve fonksiyon gösteren bileşenlerin elde edilmesi amacıyla yapılmaktadır. Proteinlerin fraksiyonlanmasında fiziksel ya da kimyasal özelliklere göre farklı metotlar kullanılmaktadır. Molekül büyüklüğü ve çözünürlük ile fraksiyonlama uygulanan metotlar çökelme ve enzimatik hidroliz iken, membran filtrasyonu ve kromatografi molekül büyüklüğü dışında yük özelliklerine bağı olarak kullanılan metotlar arasındadır (Chen vd., 2023). Proteinlerin kromatografi veya elektroforez yoluyla bir hücre lizatından fraksiyonlanması, gradyanın eğimi (zaman), organik modifiye edici konsantrasyonu, tampon pH'ı, tuz konsantrasyonu ve/veya amfolit pH'ı gibi mobil faz özelliklerinin manipülasyonu, kolonda ters faz, iyon değişimi, boyut dışlaması, normal faz özellikler veya afinite (antikor, lektin, metal, DNA, vb.) ve jel özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilir (Issaq vd., 2002). Deneyler, protein gruplarını büyüklüklerine, hidrofobik özelliklerine, yüklerine, izoelektrik noktalarına veya afinitelerine göre ayırmak için tasarlanabilir.

2.6.1. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, enzimler ile moleküller arasındaki bağı ayırarak moleküllerin daha küçük yapılara dönüştürülmesi olayıdır. İnsan vücudunda sindirim sisteminde gerçekleşmektedir. Substratın özelliğine göre enzim türü değişmektedir.

Enzimatik hidroliz sonucunda proteindeki peptit bağı kırılır, yeni amino grupları oluşur ve kopan her peptit bağına karşılık bir amino grubu bulunur. Yeni oluşan amino

gruplarının miktarı amino nitrojende doğrusal bir artışa neden olur. Bu amino nitrojen resmi titrasyonla belirlenebilir. Proteindeki bölünme için mevcut olan peptit bağlarının toplam sayısına göre düzeltilmiş amino nitrojen artışı hesaplanır. Peynir altı suyu proteinleri hidrolizatları yüksek besin değeri, düşük acılık ve düşük antijenite nedeniyle insan sütü ikamelerinin formülasyonunda ideal bileşenler olarak kabul edilir. Kısmen hidrolize edilmiş peynir altı suyu proteinleri, uygun proteaz kullanılarak, hidrolizatlardaki çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin uygun kombinasyonu, biyoaktif peptitlerin üretimi nedeniyle koruyucu ve tedavi edici sağlık yaklaşımları alanlarında önemli bir rol oynayabilir ve özel diyetler için özel miktar ve boyutlarda peptitler. Jelleşme, köpürme ve emülsiyon gibi fonksiyonel özellikler de değiştirilebilir. Laktalbüminin hidrolizatında potansiyel antioksidatif özelliklere sahip küçük peptitler gözlemlenmiş ve peynir altı suyu proteini hidrolizatında antioksidan özellikler bulunmuştur (Ghosh vd., 2017).

Proteolitik hidrolizde örneğe eklenen kimyasal veya enzim, örnekte bulunan peptit bağlarıyla reaksiyona girerek daha küçük peptitlere veya amino asitlere parçalanma ile gerçekleşir. Örnek olarak serin proteazları Ser amino asidinin olduğu ortamda peptit bağlarını ayırmaktadır. Proteaz enzimler spesifik ve spesifik olmayan enzimler olarak 2'ye ayrılır. Proteazlar çoğunlukla endoproteazlar olarak bulunurken doğada ekzoproteazlar da görülmektedir. Peptitlerin aktif forma geçmeleri için proteoliz yapılmaktadır.

2.6.2. Membran Filtrasyonu

Membran filtrasyonunda farklı molekül büyüklüğü kullanılarak ayırma işlemi uygulanmaktadır. Kolay ve basit mekanizmasından dolayı avantajlı bir yöntemdir. Dezavantajları ise yüksek maliyet ve yavaş işlem süresidir. Mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, ters ozmos ve nano filtrasyon türleri bulunmaktadır.

Membran filtrasyonu, süt konsantrasyonu ve standardizasyonu ile peynir altı suyu üretiminde kullanılmaktadır. Membran sistemleri süt endüstrisinde yağ, laktoz ve protein fraksiyonlama ve ayırma uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ayırma tekniği süt ve bileşenlerini yağ, kazein, peynir altı suyu proteinleri, laktoz ve

mineralleri büyüklük, konsantrasyon ve elektrik yüklerini baz alarak ayırmaktadır. Peynir altı suyu için kullanılan endüstriyel membran proseslerinde çapraz akışlı basınçla çalışan filtrasyonu sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemde giriş akışı, membrandan geçen bileşenleri içeren bir süzüntü (permeat) akışına ve membrandan geçemeyen kısmı içeren tutulan (retentat) akışa bölmektedir. (Chen vd., 2023).

Mikrofiltrasyon tipik olarak, ultrafiltrasyon kullanılarak peynir altı suyu proteinlerinin konsantrasyonundan önce bakteri ve yağın (partikül/çözünen madde boyutunda > 100 nm) uzaklaştırılması için bir ön arıtma adımı olarak kullanılır. En küçük peynir altı suyu proteininin (örneğin α -laktalbumin) 14 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu göz önüne alındığında, tipik olarak peynir altı suyu proteinlerini laktoz ve minerallerden ayırmak için 10 veya 20 kDa moleküler ağırlık kesim noktasına (MWCO) sahip ultrafiltrasyon membranları kullanılır. Tüm peynir altı suyu proteinlerini (kuru bazda en az %35) içeren filtrelenmemiş kısım, genellikle membran filtrasyonu veya kromatografik sistemler kullanılarak spesifik peynir altı suyu proteinlerinin fraksiyonlanması ve izolasyonu için başlangıç malzemesi olarak kullanılır. Diyafiltrasyon uygulanırsa protein içeriği %80'e kadar artırılabilir. Diyafiltrasyon sırasında, laktoz ve minerallerin eş zamanlı olarak membrandan geçmesini sağlayacak şekilde beslemeye sürekli olarak su eklenir, böylece tutulan kısımdaki protein saflığı etkili bir şekilde artırılır. Peynir altı suyu proteinlerinin fraksiyonlanması için MWCO'ları 10 ila 300 kDa arasında olan ultrafiltrasyon membranları araştırılmıştır. Rejenere selüloz (RC), polietersülfon (PES) ve poliviniliden florür (PVDF) membranları, düşük protein bağlama özellikleri sergiler ve protein çözeltilerinin işlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Bunlar arasında PES membranları, düşük maliyetleri ve iyi termal ve mekanik stabiliteleri nedeniyle süt ürünleri işlemede en yaygın olarak benimsenen UF membranıdır (Chen vd., 2023).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

Bu bölümde tez kapsamında kullanılan materyaller, numunelerin hazırlanması ile araştırma ve analiz yöntemleri ele alınmaktadır.

3.1. Materyal

Ay çekirdeği küspesi ile yapılan analizler için İpek Değirmen markasının (Aksaray, İstanbul) iç ay çekirdekleri temin edilip, Karaerler NF100 soğuk pres makinasında 40°C civarında çekirdeklerin yağı ayrılarak küspe elde edilmiştir. Peynir altı suyu numuneleri, kaşar ve beyaz olmak üzere yağsız bir şekilde Kaanlar Gıda firmasından (Malkara, Tekirdağ) temin edilmiştir.

Analizlerde Novozymes 2.4 AU/g Alcalase (3.4.21.62) ve 1000 U/g Flavourzyme enzimleri, Sigma Aldrich ACE (A6778-1G), DPP-IV (D4943-1VL), pepsin (P6887-1G) ve pankreatin (P3292) kullanılmıştır. Ticari analitik düzey kimyasallar, Sigma Aldrich hidroklorik asit (320331), sodyum hidroksit (S5882), sodyum azid (S2002), trifloroasetik asit (T6508), TNBS (P2297), kaptopril (PHR1307), tris (T1503), etanol (34852-M), Merck sodyum dodesil sülfat (8170349020), metanol (1060072500) ve Isolab sodyum asetat anhidrat (969.176) analizlerde kullanılmıştır.

3.2. Proteinlerin İzolasyonu

Ay çekirdeği küspesi protein izolatları AE-IP (alkali ekstraksiyonu – izoelektrik çöktürme, “alkali extraction – isoelectric precipitation”) metodu (Göksu vd., 2022) kullanılarak elde edildi. Ay çekirdeği küspeleri bıçaklı karıştırıcıda öğütüldükten sonra pH 9.5’e 2 M NaOH ve küspe ile saf su 1:15 (w/v) oranında 1 saat boyunca karıştırıldı. Ay çekirdeği küspeleri 11.000 xg, 25 dakika koşullarında santrifüj (Himac CR22N, Hitachi, Japonya) işleminden geçirildikten sonra, filtre kağıdından kaba süzüldü. Süzüntü kısmı pH 4.5’a 2 M HCl ile ayarlayarak sabitlendi. Yeniden 11.000 xg hızında ve 25 dakika boyunca santrifüj edilerek çökelen proteinler pH 7’ye ayarlandıktan sonra

liyofilizatör (TRS 2-2V, Teknosem, İstanbul, Türkiye) ile dondurarak kurutma işleminden geçirildi. Liyofilizat öğütülerek toz haline getirildikten sonra buzdolabında saklandı (+4°C).

Yağsız peynir altı suyu numuneleri ise ultrafiltrasyon yöntemi (Cemiloğlu, 2019) ile Vivaflow 200 markalı 10 kDa MWCO PES (polietersülfon) membran kasetinden filtre edilerek 30 kat hacmen konsantre elde edildi. Konsantrenin mikrobiyel bozulmasını önlemek amacıyla numunelere %0.02 sodyum azid eklendi. Analizlerde kullanılmak üzere elde edilen peynir altı suyu numuneleri, -20°C'de en fazla 6 ay kalacak şekilde depolandı.

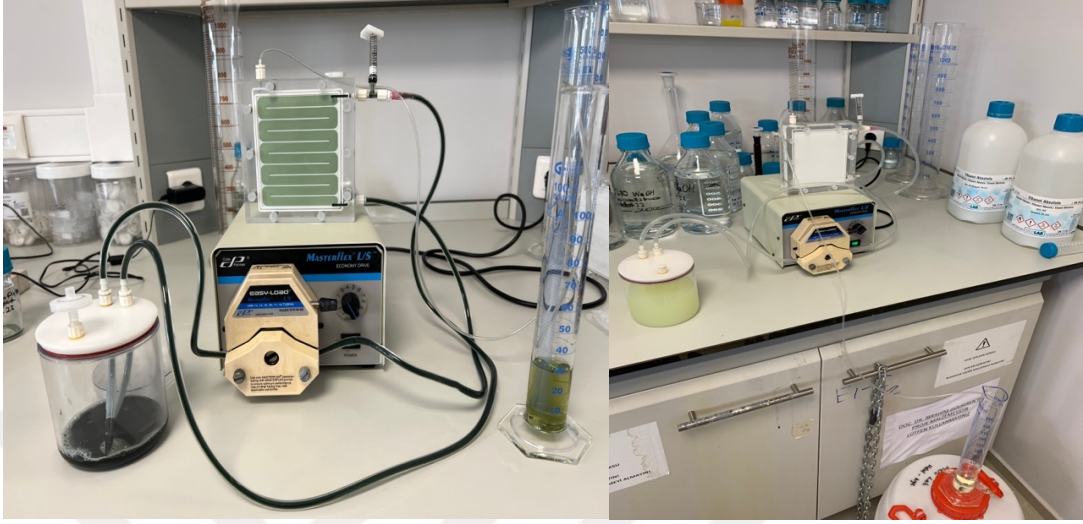
3.3. Protein İzolatlarının Proteolizi

Ay çekirdeği protein izolatları suda %10'luk çözelti oluşturacak şekilde çözüldü. Ay çekirdeği proteinli karışım ve peynir altı suyu konsantrelerine ayrı ayrı 2.4 AU/g Alcalase enzimi eklendi ve pH 8'e ayarlandı. Karışım önceden ayarlanmış 50°C'lik su banyosunda 2 saat boyunca karıştırıldı. Ardından 1000 U/g Flavourenzyme eklenerek ortamın pH değeri 6'ya sabitlendikten sonra 50°C'lik su banyosunda proteoliz işlemi 1.000 rpm değerinde 2-18 saat boyunca yürütüldü. İşlem sonunda 95°C'lik su banyosunda 5 dakika enzim inaktivasyonu gerçekleştirildikten sonra buz banyosu ile soğutma işlemi yapıldı. Soğutulan karışım, 10.000 xg değerinde 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısım analizlerde kullanılmak üzere numune kabına alındı.

3.4. Proteolitik Hidrolizatların UF Bazlı Fraksiyonlaması

Protein hidrolizatlarına 3, 5 ve 10 kDa MWCO (molecular weight cut-off: molekül ağırlığı ayırma sınırı) ultrafiltrasyon membranları kullanılarak fraksiyonlama uygulandı. Elde edilen fraksiyonlar analiz yapılana kadar -20°C'da saklandı. Şekil 3.1'de ay çekirdeği ve peynir altı suyu hidrolizatlarının 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek fraksiyonlanması işlemi gösterilmektedir. Sol taraftaki büyük hazne besleme ünitesi, ortadaki cihaz filtre ve altında pompa mekanizması ve sağ tarafta ise toplama haznesi görülmektedir. Sağ tarafta elde edilen numune permeat,

işlem sonunda sol tarafta filtreden geri dönen kısım ise retentat olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.1: Ay çekirdeği ve peynir altı suyu hidrolizatlarının 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek fraksiyonlanması

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.5. Hidrolizatların Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi

Elde edilen protein hidrolizatlarının hidroliz dereceleri TNBS metodu (Adler-Nissen, 1979) ve grubumuz tarafından yayınlanmış yöntem (Göksu vd., 2022) modifiye edilerek belirlendi. Bu amaçla 1 mg/ml hidrolizat ve 1 ml 0.2 M sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 8.2) falkon tüplerinde 3 paralelli olarak hazırlandı. Bu karışımdan 200 µl 0.45 µm PTFE (politetra-floretilen) filtreden geçirilmiş hidrolizat alındı ve üzerine 200 µl 0.2 M sodyum fosfat tampon çözeltisi eklenip ardından vortekslendi. Vorteks uygulanan karışımın üzerine 400 µl %0.44'lük SDS (sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenip tekrar vortekslendi. Kör örnek için 400 µl 0.2 M sodyum fosfat tampon çözeltisi bir tüpe hazırlandı ve üzerine 400 µl %0.44'lük SDS eklendi. Tüm örnekler 190 µl sodyum fosfat tampon çözeltisi eklendi ve karışımlar vortekslendi. Örnekler üzerine 300 µl %0.1 TNBS eklenip karışım vortekslendi. Önceden 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda örnekler ağzı kapalı şekilde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler çıkarılıp üzerlerine 0.1 M HCl eklenerek vortekslendikten sonra 340 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Numunede bulunan toplam amino grubu sayısı h_{tot} ,

örnekteki tamamen hidrolize olan peptit bağları ile hesaplandı. Yüzde cinsinden denklem 3.1 kullanılarak hidroliz derecesi hesap edildi.

$$\%Hidroliz Derecesi = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (3.1)$$

h = hidroliz edilmiş peptit bağ sayısı

h_{tot} = toplam mevcut peptit bağ sayısı

3.6. Biyoaktivite Testleri

Elde edilen proteinlerin hidrolizat fraksiyonlarının *in vitro* biyoaktivitelerini ölçmek amacıyla ACE ve DPP-IV önleyici testler yapıldı. Bu testlerde enzim inhibisyon değerleri hesaplanarak değerlendirildi.

3.6.1. ACE-Önleyici Aktivite Testleri

ACE-önleyici aktivite testi için HPLC cihazı kullanıldı. Yöntem olarak (Sheih vd., 2009), modifiye edilerek kullanıldı. HPLC cihazı sistemi olarak C18 kolonu, sıvı kromatografi LC-20AD solvent dağıtıcı modülü, SIL20A HT oto örnekleyici, DGU-20A5R degazer, SPD-20A UV-VİS detektör ve CTO-10AS VP kolon fırını kullanıldı. Substrat olarak Hippuril-His-Leu (HHL, H1635) kullanıldı ve test ile HHL'nin hippurik aside (HA) ve His-Leu dipeptidine parçalanma kinetiği ölçüldü. Karışımlara 0.3 M NaCl eklenerek ACE aktivitesi gözlemlendi (Çağlar, Çakır, & Gülseren, 2021). Analiz için 100 mM pH 8.3 sodyum borat tampon çözeltisi, 0.02M Tris-0.8M NaCl, 6.5 µM HHL+0.8M NaCl ve HPLC için %50 metanol + %0.1 trifluoroasetik asit mobil fazı hazırlandı. Peptit fraksiyonlarından 90 µl tüplere alınarak üzerine 50 µl HHL+NaCl eklendi. Ön inkübasyon için örnekler ağzı kapalı şekilde 500 rpm hızında 10 dakika boyunca 37°C su banyosunda karıştırıldı. Süre bitiminde örneklere 40 µl ACE enzimi eklenip vortekslendikten sonra ağzı kapalı şekilde 500 rpm değerinde 1 saat boyunca 37°C su banyosunda karıştırıldı. Referans inhibitör olarak kaptopril kullanıldı. Kaptopril 0.05 µM konsantrasyonunda olacak şekilde Tris-HCl+0.6M NaCl tamponunda çözündürülerek hazırlandı. Örnekler 228 nm absorbans değerinde 0.6 ml/dakika akış hızı ve 10 µl enjeksiyon hacmi koşullarında HPLC cihazında analiz edildi. Tüm örnekler iki paralelli olarak çalışıldı. Analizin prensibi ACE enziminin HHL substratını katalize ederek ortama hippurik asit (HA) salınımına sebebiyet

vermesidir (Paiva vd., 2017). Yönteme uygun olarak analiz edilen örneklerin HA içeriği saptanarak inhibisyon yüzdeleri denklem 3.2'ye uygun olarak hesaplandı.

$$\%inhibisyon = \frac{A_{Negatif Kontrol} - A_{örnek}}{A_{Negatif Kontrol} - A_{kör}} \quad (3.2)$$

A = 228 nm'de elde edilen pik alanı

3.6.2. DPP-IV Önleyici Aktivite Testleri

DPP-IV biyoaktivite testinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı (Nongonierma vd., 2017). Analizde substrat olarak 0.8 µM Gly-Pro-pNA, tampon çözeltisi olarak 100 µM Tris pH 8 kullanıldı. Örnek tüplerine 50 µl peptid fraksiyonlar ve 50 µl substrat eklendikten sonra ön inkübasyon işlemi için 500 rpm hızında 10 dakika boyunca 37°C su banyosunda karıştırıldı. İnkübasyon sonunda 0.01 ünite/ml DPP-IV enziminden 100 µl ekledikten sonra tekrarda 37°C 500 rpm hızında 1 saat boyunca 37°C'da inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda tepkimeyi durdurmak amacıyla 200 µl 1M sodyum asetat tamponu pH 4 eklendi. Kör ve negatif kontrol substrat ve tampon çözeltiyle hazırlandı. Pozitif kontrol için 2 µM Diprotin A 100 µM Tris pH 8 tampon çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Tüm örnekler 2 paralelli olarak çalışıldı. Shimadzu Biospec NanoDrop spektrofotometresi ile 405 nm dalgaboyunda % inhibisyon değerleri denklem 3.3 ile hesaplandı.

$$\%inhibisyon = \frac{A_{Negatif Kontrol} - A_{örnek}}{A_{Negatif Kontrol} - A_{kör}} \quad (3.3)$$

A = 405 nm'de ölçülen absorbans değeri

3.7. Biyoaktif Peptit Fraksiyonlarının Ürün Geliştirme Denemelerinde Değerlendirilmesi ve Depolama Testleri

Biyoaktif protein hidrolizatı eklenen ürünler makarna, dondurma ve pudingden oluşmaktadır. Dondurma yapımı için Cuisinart ICE30BCE Dondurma Makinesi ve makarna için Philips HR2382/15 Makarna Makinesi kullanıldı. Makarna kurutmak amacıyla Dalle BY1147-1 marka meyve-sebze kurutma fırını kullanılmıştır. Puding için pişirme amaçlı olarak Teka marka elektrikli ocak kullanıldı. Ürünlere %1 veya 5 içeriğinde protein izolatları eklenerek ön denemeler yapıldı. Ürünlerin temel içerikleri, kullanılan cihazların kullanım talimatında önerilen miktar çerçevesinde uygulandı.

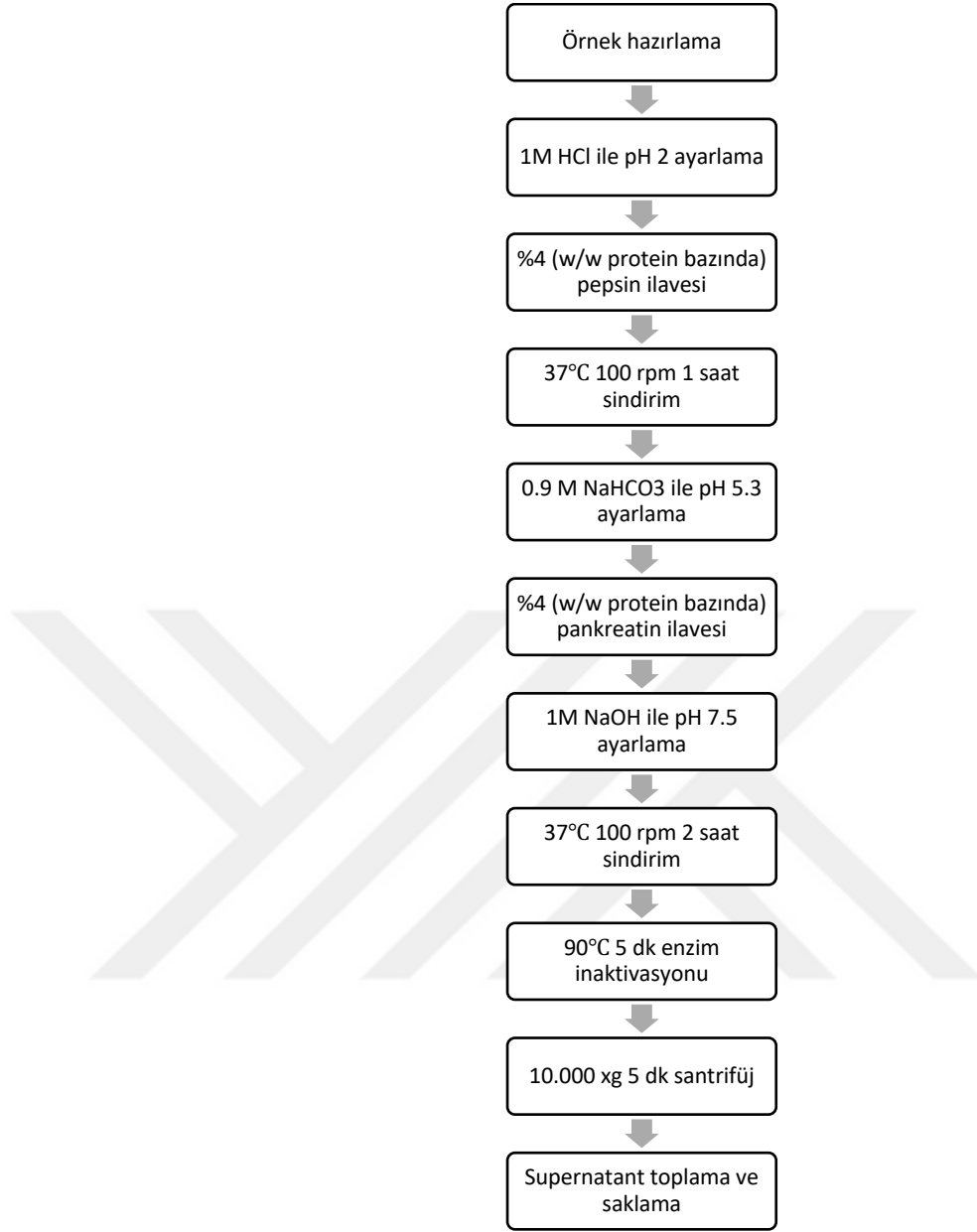
Dondurma yapımında 400 ml krema, 200 ml süt ve 115 g şeker kullanılmıştır. Protein hidrolizatı eklendikten sonra karışım 2 saat +4°C'de bekletildi. Dondurma makinesinde yaklaşık 25 dakikada dondurma elde edildi. Numuneler analizlere kadar -20°C'de saklandı.

Makarna için 200 g irmik, 50 g un ve 95 ml su kullanılarak hamur oluşturuldu. Mikrobiyal bozulmayı önlemek amacıyla hamura %0.1 kalsiyum propiyonat eklendi. Protein hidrolizatı önceden suyla karıştırılıp harca eklendi. Elde edilen makarnalar mikrobiyal bozulmayı önlemek ve endüstriyel makarnalara yakın bir tekstür elde etmek amacıyla 70°C'de 7 saat boyunca kurutulduktan sonra oda sıcaklığında plastik ambalajda saklandı.

Puding denemelerinde tekrar edilebilirliğin yüksek olması açısından Kent Boringer marka hazır vanilyalı puding toz karışımı (ürün no: MYT01245) ürün kullanıldı. Hazır vanilyalı toz pudingin bileşiminde sırasıyla şeker, mısır nişastası, vanilya aroma vericisi, vanilya ekstraktı (%0.2), tuz, kıvam artırıcı (karragenan) ve renklendirici (beta karoten) bulunmaktadır. Kıvamın tutması amacıyla 20 g puding tozuna 72 ml kadar süt eklenip ocakta kıvam alana kadar pişirildi. Protein hidrolizatı pişirme öncesinde sütle karıştırılıp karışıma eklendi. Numuneler soğuduktan sonra +4°C'de ağzı kapalı kapta saklandı.

3.9. Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Analizleri

Sindirim simülasyonu için %2 ila %5 ay çekirdeği, kaşar ve beyaz PAS fraksiyonları eklenmiş gıda örnekleri üretim gününde kullanılmıştır. Sindirim simülasyonunda en yaygın metotlardan biri olan INFOGEST, pH sabit tutularak uygulanan bir yöntem olmasından dolayı sindirim kinetiğini simüle edememesi yönünden dezavantajlı olmaktadır (Brodkorb vd., 2019). Bu nedenle sindirim kinetiğini yansıtan farklı bir yöntem araştırılarak uygulanmıştır. Yapılan bir çalışmanın (Rivero-Pino vd., 2020) sindirim metodu modifiye edilerek, örnekler pH 2'ye ayarlandıktan sonra pepsin eklenmiş ve 37°C'de 100 rpm 1 saat boyunca mide sindirimi simüle edilmiştir. Mide sindirimi tamamlanan örneklerin pH değeri 5.3 seviyesinde ayarlanıp örnekler pankreatin eklenmiştir. Aynı koşullarda pH 7.5'e ayarlanmış örnekler 2 saat sindirildikten sonra reaksiyon durdurulmuştur. Şekil 3.2'de sindirim simülasyonu iş akışı gösterilmektedir.



Şekil 3.2: Sindirim simülasyonu

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.10. LC-MS/MS Analizleri

Sıvı kromatografi kütle spektrometri analizleri için Waters ACQUITY UPLC I-CLASS PLUS LC System, Xevo TQ-XS Mass Spectrometer cihazı ve BEH C18 kolonu (2.1 mm x 50 mm x 1.7 µm) kullanılmıştır. Analiz için örneklerden 1 g tartılarak numune kabına alınmıştır. Makarna örneği analiz için önceden haşlanmıştır. Tüm örnekler tartıldıktan sonra mobil faz A ve B hazırlanmıştır. Mobil faz A için %0.05 formik asit içeren ultra saf su ve mobil faz B için %0.05 formik asit içeren asetonitril hazırlanmıştır. Örnekler numune ve mobil faz A ile 1:10 şeklinde hazırlanmıştır. Bir süre çözüldükten sonra 22 µm CA (cellulose acetate) selüloz asetat filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Cihazın kolon sıcaklığı 40°C, numune sıcaklığı 20°C, enjeksiyon miktarı 5 µl ve akış hızı 0.5 ml/dk şeklinde ayarlanmıştır. İyonizasyon modu ESI pozitif, edinim mod MRM ve kütle taraması, kapiler voltaj 0.5 kV, çarpışma enerjisi 20-40 eV ve koni voltajı ise 70 V olarak belirlenmiştir. Basamaklaşma sistemi 0-5 dk %15, 5-8 dk %25, 8-10 dk %50, 10-15 dk %85, 15-30 dk %90, 30-35 dk %80 ve 35-40 dk %15 mobil faz B şeklinde ayarlanarak her numune için toplam 40 dakika analiz işlem süresi belirlenmiştir.

MS verilerinin edinilmesinin ardından, tanımlanan peptit dizilerinin fizikokimyasal ve potansiyel biyoaktif özelliklerini tahmin etmek için *in silico* analizler yürütüldü. Ay çekirdeğinden türetilen peptitlerin fizikokimyasal özelliklerini tahmin etmek için ToxinPred (Gupta vd., 2013) ve Protparam (Gasteiger vd., 2005) kullanıldı. Biyoaktif peptit dizilerinin olasılığını değerlendirmek için PeptideRanker (Mooney vd., 2012) kullanıldı. Ay çekirdeği peptitlerinin potansiyel ACE veya DPP-IV inhibitör etkilerini tahmin etmek için BIOPEP aracı (Minkiewicz vd., 2019) kullanıldı ve burada ilgili BIOPEP A ve B parametreleri raporlandı. PeptideRanker değerleri > 0,5 veya yüksek BIOPEP A/B değerlerine sahip potansiyel olarak biyoaktif diziler, MS verilerinin analizinde kullanıldı. Ay çekirdeği peptitlerinin atomik düzeyde ACE ve DPP-IV ile nasıl etkileşime girdiğine dair ayrıntılı bir bilgi edinmek amacıyla moleküler docking çalışmaları kullanılmıştır. Bu çalışmalar ay çekirdeği peptitlerinin HPEPDOCK ve CABS-Dock platformlarını kullanarak ACE ve DPP-IV enzimi ile yerleştirilmesini içermektedir. İki aracın sonuçları karşılaştırılarak bulguların doğruluğu kontrol edildi. HPEPDOCK, protein-peptit yerleştirmesini analiz etmek için hiyerarşik bir yaklaşım kullanır ve protein-ligand bağlanma afinitesini tahmin etmek için serbest enerjiyi

(kcal/mol cinsinden) belirten yerleştirme puanları sağlamaktadır. Öte yandan, CABS-Dock, bir bağlanma yeri araması sırasında peptit yapısının tam esnekliğine ve protein parçalarının kapsamlı esnekliğine izin vermektedir.



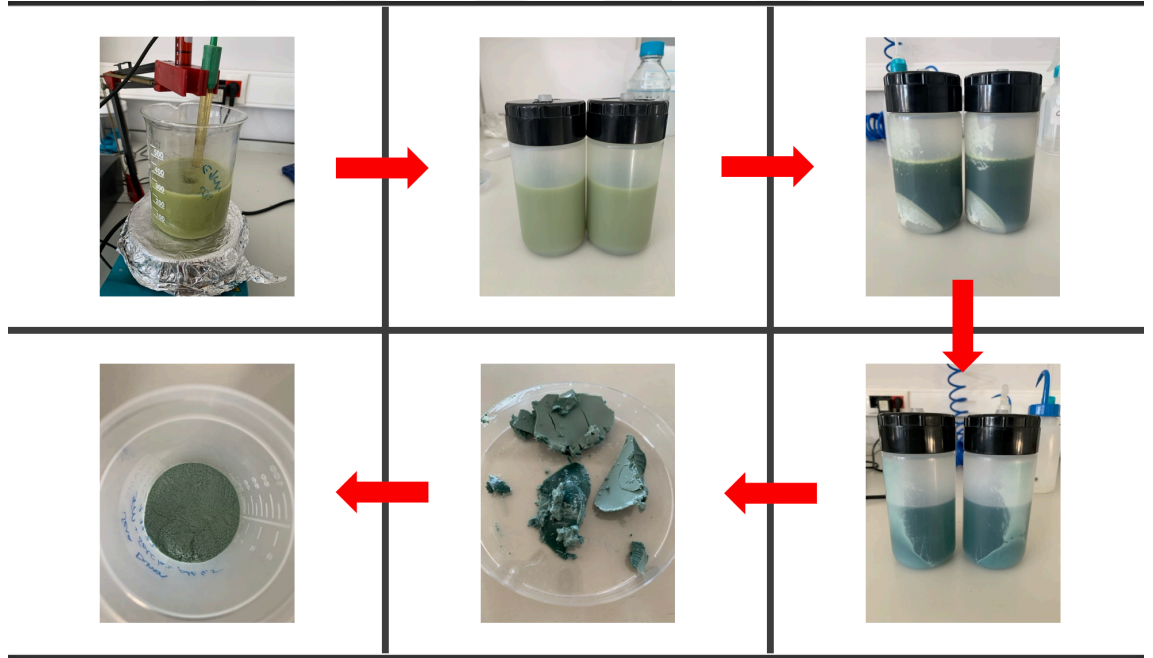
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde elde edilen bulguların analizine yer verilecektir. Biyoaktif peptit içeren protein hidrolizatların biyoaktivitesinin incelenmesi amacıyla yürütülen çalışmada elde edilen veriler değerlendirilecektir.

4.1. Protein Tayini

Soğuk preslenmiş ay çekirdeği keki, protein izolatu eldesinde daha önce bahsedilen işlemlerden geçirilerek elde edilmiştir. Şekil 4.1’de bu yöntemle elde edilen ay çekirdeği protein izolatının üretim akış şeması verilmiştir. Kek ile saf su karışımı 1:15 oranında hazırlandıktan sonra AE-IP yöntemi sonucunda santrifüj ile süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan çökelti liyofilize edilerek protein izolatları elde edilmiştir.



Şekil 4.1: AE-IP yöntemi ile ay çekirdeği protein izolatu eldesi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Elde edilen protein örneklerinden 1 g'lık numuneler alınarak Kjeldahl yöntemi ile protein tayini yapılmıştır. Ek 1’de Kjeldahl yönteminde yakma işlemi için hazırlanan örnekler gösterilmektedir. Yakma işleminden sonra distilasyon işlemi ve titrasyon sonrası renk değişimi gözlenen örnekler Şekil 4.2’de verilmektedir. Örneklerde renk

değişimi, distilasyon sırasında açığa çıkan amonyum borat ile titrasyonda kullanılan hidroklorik asit ile reaksiyonundan amonyum klorür ve borik asit oluşmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Azot miktarı buradan hesaplanmaktadır.



Şekil 4.2: Kjeldahl metodu protein tayininde distilasyon cihazı ve titrasyon öncesi ve sonrası renk değişimi gözlenen örnekler

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kjeldahl yöntemiyle yakma, distilasyon ve titrasyon uygulamaları sonucunda protein miktarları belirlenmiştir. Tablo 4.1’de ay çekirdeği proteinleri ve hidrolizat fraksiyonlarının protein içerikleri (%) gösterilmektedir. Sonuçlara göre en yüksek protein yüzdesine sahip örnek olarak ay çekirdeği protein izolatu bulunmuştur. Hidrolizat fraksiyonları arasında membranlardan 10 kDa retentat örneği en yüksek protein içeriğine (%) sahiptir. Ultrafiltrasyon işlemi uygulanan hidrolizat örnekleri, membrandan süzülen permeat içerisinde 10 kDa gözeneklerinden daha küçük boyutta moleküller içermektedir. Retentatta kalan ve büyüklüğü 10 kDa ile daha büyük olan moleküller fazla ve konsantre halde bulunmaları sonucunda daha yüksek protein miktarları içerdikleri gözlemlenmiştir.

Kaşar ve beyaz peynir altı suyu numunelerinin hazırlanması hacmen 30 kat konsantre peynir altı suyu numuneleri kullanmanın protein içeriği bakımından izolat, hidrolizat ve konsantrelere oranla en yüksek değer olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1: Protein örneklerinin içeriği (%)

Örnek	% protein
APK	53.8 ± 0.4
API	88.2 ± 0.1
APH	8.2 ± 0.0
APH 10 kDa retentat	34.1 ± 2.9
APH 10 kDa permeat	2.6 ± 0.0
APH 3 kDa retentat	5.0 ± 0.2
Kaşar peynir altı suyu	1.41 ± 0.1
Kaşar PAS 5x konsantre	6.1 ± 0.1
Kaşar PAS 30x konsantre	10.8 ± 0.9
KPH	1.27 ± 0.0
Beyaz peynir altı suyu	0.5 ± 0.0
Beyaz PAS 5x konsantre	2.46 ± 0.1
Beyaz PAS 30x konsantre	5.46 ± 0.1

APK: Soğuk sıkım ay çekirdeği keki; API: Ay çekirdeği protein izolatı; APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizatı; PAS: Peynir altı suyu; KPH: Kaşar PAS hidrolizatı

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.2. Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi Analizi

Elde edilmiş hidrolizatlar ve ultrafiltrasyon yöntemi ile fraksiyonlama işlemine tabi tutularak fraksiyonların hidroliz dereceleri ölçülmüştür. Örnekler molekül büyüklük sırasına göre, fraksiyonlara ayırma ve işlem kolaylığı amacıyla önce 10 kDa ve daha sonra 3 kDa membran büyüklüğündeki ultrafiltrasyon kasetlerinden geçirilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi sırasında membrandan geçen ve üstte kalan kısımlar ayrıca toplanmış ve toplanan örneklerin hidroliz dereceleri ölçülmüştür.

Tablo 4.2’de ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizat fraksiyonlarının hidroliz derecesi yüzdeleri verilmektedir. Permeat (filtreden geçen, süzüntü) örnekler <10 kDa ve <3 kDa olarak gösterilirken 3 ve 10 kDa arasındaki örnekler ile >10 kDa ve >3 kDa şeklinde belirtilen örnekler retentat ya da filtreden geçmeyen kısım olarak adlandırılmaktadır.

Hidroliz derecesi en yüksek örneklerin 10 kDa membrandan geçirilen permeat (<10 kDa) olduğu tespit edildiğinden fraksiyon örnekleri biyoaktivite testleri ve ürün uygulamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Örneklerden 10 kDa permeatın hidroliz derecesi artarken, 3 kDa permeat örneklerde daha düşük değerler gözlemlenmiştir. Bir çalışmada molekül ağırlığı küçük peptitleri daha fazla içeren örneklerin hidroliz derecesi daha yüksek çıkmıştır (Zhao vd., 2024). Dolayısıyla 10 kDa permeat örneklerin daha yüksek hidroliz derecelerine sahip olmalarının nedeni sayıca daha fazla küçük molekül ağırlıkta peptit içerdikleri söylenebilmektedir.

Önceki literatürde de kombine şekilde endo ve ekzo-proteazların kullanımının proteoliz derecesini artırdığı görülmüştür (Villanueva vd., 1999). Bu durum baz alındığında, Alcalase ve Flavourzyme proteazlarının beraber kullanımı hidroliz derecesini artırdığı söylenebilir. Örneğin; Alcalase uygulanan peynir altı suyu numuneleri ile kontrol numunenin hidroliz dereceleri ve ACE inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında, yüksek hidroliz derecesine sahip hidrolizat örneğinin kontrole oranla 10 kat daha yüksek ACE inhibisyon değeri gösterdiği görülmüştür (Eberhardt vd., 2019). Bu tez çalışmasında yüksek hidroliz derecesi olan numuneler enzim ve fraksiyonlama uygulamaları ile peptitlerin biyoaktivitelerinin iyileştirilmesi amacıyla seçilerek analizler yapılmıştır.

Beyaz ve kaşar peynir altı suyu numuneleri 10 kDa ultrafiltrasyon kasedi ile 30 kat hacmen konsantre edildikten sonra enzimatik hidroliz işlemlerine tabi tutulmuştur. Öğütülmüş soğuk pres ay çekirdeği kekinden AE-IP yöntemi ile protein izole edildikten ve ardından liyofilizasyon uygulandıktan sonra 1:10 saf su ile seyreltilerek izolatlar sırasıyla Alcalase ve Flavourzyme ile hidroliz edildi. Alcalase ve Flavourzyme proteazları ile muamele edilen beyaz ve kaşar peynir altı suyu numuneleri ve ay çekirdeği hidrolizat örnekleri Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3: Alcalase ve Flavourzyme uygulanan sırasıyla beyaz ile kaşar peynir altı suyu numuneleri hidrolizat ve ay çekirdeği protein hidrolizatları örnekleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Spektrofotometrik yöntem (Göksu vd., 2022) ile ölçülen absorbans değerlerine göre, Hidroliz derecesi hesaplanmıştır. Şekil 4.4 üzerinde 340 nm absorbansı ölçülen ay çekirdeği protein hidrolizat örnekleri görülmektedir. Seyreltmeler 1:1, 1:2 ve 1:10 şeklinde uygulanan hidrolizat örnekleri kullanılarak denemeler yapılmıştır. Sırasıyla kaşar peynir altı suyu numuneleri, ay çekirdeği ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi analizi (TNBS testi) sırasında görselleri ise Şekil 4.5'te gözlemlenmektedir. Hidrolizatların analizi bitiminde renk farklılığı gözlemlenmiştir. Bu analizde renk doğru ölçüm alamamaya sebep olduğundan dolayı istenmeyen bir parametre olmakla beraber içerisindeki renk maddelerinin azaltılması seyreltilerek yapılmıştır. Sırasıyla kaşar PAS 10 kDa permeat, 3 kDa retentat ve permeat örnekleri hidroliz derecesi (TNBS) analizi örnekleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Kaşar PAS 10 kDa permeat ve 3 kDa retentat örneklerinin hidroliz derecelerine bakıldığında Tablo 4.2'ye göre çok yakın değer göstermektedir. Şekil 4.6'da bu örneklerin renklerinin de çok yakın olduğu görülmektedir. Kaşar PAS 3 kDa permeatın ise hem renk açısından daha açık hem de hidroliz derecesi daha düşük olduğu görülmektedir. Daha fazla küçük peptitlerin varlığı, daha yüksek hidroliz derecesine neden olması ve daha derişik gözükmesine neden olduğu söylenebilmektedir.



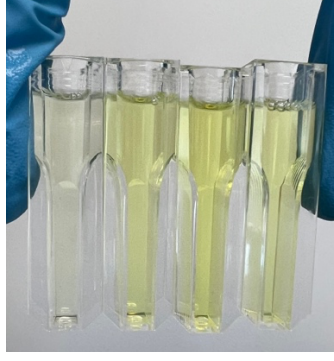
Şekil 4.4: Absorbansı 340 nm dalga boyunda ölçülen hidroliz derecesi belirleme analiz APH örnekleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.5: Sırasıyla kaşar peynir altı suyu, ay çekirdeği ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (TNBS) analizi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.6: Sırasıyla kör, kaşar PAS 10 kDa permeat, 3 kDa retentat ve permeat örnekleri hidroliz derecesi (TNBS) analizi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Hidrolizat, 3 kDa ve 10 kDa membranlarından geçirilen permeat ve retentat fraksiyonlarının hidroliz dereceleri Tablo 4.2’de verilmiştir. En yüksek hidroliz derecesi (%) ay çekirdeği protein hidrolizatının 3 kDa retentat fraksiyonunda görülmüştür. Bu sonuca bağlı olarak 3 ile 10 kDa arasında bulunan ay çekirdeği peptitlerin çözünürlüğünün yüksek olduğu söylenebilmektedir. Bununla beraber, ay çekirdeği hidrolizatı 10 kDa permeat fraksiyon örneğinin hidroliz derecesinin %60.6 ile istatistiksel olarak farklı bir değerinin olduğu görülmektedir. Kaşar ve beyaz peynir altı suyu örneklerinde ise 10 kDa permeat numunelerinin çözünürlüğünün diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2: Hidrolizat ve fraksiyonların hidroliz dereceleri (%)

Örnek	% HD
APH	16.4 ± 1.0
APH >10 kDa	60.6 ± 2.3
APH <10 kDa	67.8 ± 1.2
3< APH <10 kDa	78.5 ± 1.1
APH <3 kDa	9.7 ± 0.1
KPH	4.1 ± 0.3
KPH <10 kDa	25.6 ± 0.6
3< KPH <10 kDa	25.4 ± 0.2
KPH <3 kDa	11.9 ± 0.1
BPH	11.6 ± 1.0
BPH <10 kDa	31.3 ± 0.7
3< BPH <10 kDa	20.3 ± 0.7
KPH <3 kDa	12.0 ± 0.9

APH: Ay çekirdeği protein hidrolizati, KPH: Kaşar PAS hidrolizati, BPH: Beyaz PAS hidrolizati, HD: Hidroliz derecesi.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ay çekirdeği proteini üzerine yapılan benzer bir çalışmada, Alcalase ve Flavourzyme eklenen ayçiçeği protein dipersiyonunda 3 saatlik enzimatik proteoliz sonucunda yaklaşık %54 hidroliz derecesi bulunmuştur (Villanueva vd., 1999). Farklı solüsyon ile hazırlanan ay çekirdeği proteini örneğinin %54 çıkması ile Tablo 4.2'de ay çekirdeği protein hidrolizatının hidroliz derecesinin yaklaşık %16 çıkması ile karşılaştırıldığında çok farklı değerler olduğu gözlenmektedir. Bu durum, kullanılan iç ay çekirdeği ve iç ay çekirdeği ürün içeriği, solüsyon ve yoğunluk farklılığı veya kullanılan enzim miktarı bakımından değişiklik gösterebildiği söylenebilmektedir.

Ay çekirdeği protein hidrolizatı ve fraksiyonlarında hidroliz derece ve biyoaktivitenin yanı sıra antioksidan biyoaktif peptitler içerip içermediğini araştırmak amacıyla analizler yapılmıştır. Ay çekirdeği protein hidrolizatı ve 3 ile 10 kDa retentat ve permeat fraksiyonlarına toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi analizleri uygulanmıştır. Antioksidan özelliklerin verildiği Ek 2’de, en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip örnekler 3 ve 10 kDa permeat fraksiyonları, antioksidan aktivitesi bakımından da en yüksek örnek 10 kDa retentat olarak hesaplanmıştır. Buna göre protein miktarı, çözünürlük ve biyoaktif özelliklerinin yanı sıra antioksidan özelliklerinin yüksek olması nedeniyle hem insan sağlığı hem de raf ömrü açısından olumlu etkilere sahip olabileceği söylenebilmektedir. Bir çalışmaya göre 20 mg GAE/mg üzerinde antioksidan özelliğe sahip meyveler yüksek fenolik içeriğe sahip olarak tanımlanmıştır (Kähkönen vd., 1999). Buğday rüşeymi Alcalase hidrolizatında yüksek aminoasit miktarı bulunmuş ve yüksek antioksidan özellik gösterdiği vurgulanmıştır (Akıllıoğlu ve Yalçın, 2010).. Ek 2’deki veriler değerlendirildiğinde fraksiyonların yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu söylenebilmektedir.

Ay çekirdeği hidrolizatı 3 kDa fraksiyonunda süreye bağlı olarak toplanan numunelerin hidroliz derecesi, ACE ve DPP-IV inhibisyon değerleri sırasıyla Ek 3 ve Ek 4’te verilmektedir. Ek 3 ve Ek 4’te verilen değerler lineer bir artış veya azalma göstermediğinden dolayı süreye bağlı bir yorum yapılamamaktadır.

4.3. Biyoaktivite Testleri

Bu bölümde hidrolizat, fraksiyon ve gıda numunelerine uygulanan biyoaktivite testleri ve analiz sonuçlarına ilişkin veriler sunulmuştur.

4.3.1. ACE önleyici aktivite testleri

Ultrafiltrasyon yöntemi ile elde edilen ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu protein hidrolizatları ve bunların 3, 5 ve 10 kDa fraksiyonlarının ACE inhibisyon (%) değerleri Tablo 4.3 üzerinde verilmektedir. ACE önleyici aktivite değerlerinde en yüksek (%) inhibisyon kaşar peynir altı suyu 3 kDa retentatı ile beyaz peynir altı suyu hidrolizat, 10 kDa permeat ve 3 kDa retentat örnekleri bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada ayçiçeği küspesinin alkalaz ve kimosin ile kimotripsin hidrolizatlarının DPP4 ve ACE inhibisyon değerleri 5 kDa permeat ve retentat fraksiyonları karşılaştırıldığında permeat fraksiyonlarının daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir(Şimşek, 2022). Alkalaz ve kimosin ile kimotripsin karşılaştırıldığında bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Buna bağlı olarak molekül ağırlığı küçüldükçe ACE ve DPP-IV inhibisyon özelliği gösteren biyoaktif peptitlerin varlığından daha çok bahsedilebilmektedir.

Tablo 4.3: Hidrolizat örneklerinin ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)

Örnek	% ACE inhibisyon
APH	79.7 ± 3.8
APH 10 kDa permeat	96.3 ± 0.1
APH 5 kDa retentat	83.0 ± 4.6
APH 5 kDa permeat	84.3 ± 12.5
APH 3 kDa retentat	75.5 ± 3.7
APH 3 kDa permeat	86.7 ± 2.0
KPH	90.6 ± 1.2
KPH 10 kDa permeat	98.2 ± 1.2
KPH 3 kDa retentat	100.0 ± 1.3
KPH 3 kDa permeat	91.4 ± 5.9
BPH	100.0 ± 0.7
BPH 10 kDa permeat	100.0 ± 6.0
BPH 3 kDa retentat	100.0 ± 2.5
BPH 3 kDa permeat	92.1 ± 6.0

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizati; KPH: Kaşar PAS hidrolizati; BPH: Beyaz PAS hidrolizati.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3.2. DPP-IV önleyici aktivite testleri

Tablo 4.4 üzerinde ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizatları ve fraksiyonlarının DPP-IV inhibe edici aktive (%) değerleri verilmektedir. En yüksek değer görülen örnek %99.7 ile kaşar peynir altı suyu hidrolizatının 3 kDa retentat fraksiyonu olarak bulunmuştur. Değeri %98.8 inhibisyon ile beyaz peynir altı suyu hidrolizatı 3 kDa permeat örneğinin yüksek bir aktivite gösterdiği gözlenmektedir.

Tablo 4.4: Hidrolizat örneklerinin DPP-IV inhibisyon değerleri (%)

Örnek	% DPP-IV inhibisyon
APH 10 kDa permeat	70.6 ± 3.2
APH 5 kDa retentat	55.0 ± 1.2
APH 5 kDa permeat	53.8 ± 2.2
APH 3 kDa retentat	33.3 ± 1.8
APH 3 kDa permeat	75.0 ± 0.3
KPH	36.4 ± 9.4
KPH 10 kDa permeat	71.1 ± 6.7
KPH 3 kDa retentat	99.7 ± 6.9
KPH 3 kDa permeat	87.0 ± 8.0
BPH	31.1 ± 2.1
BPH 10 kDa permeat	72.6 ± 6.9
BPH 3 kDa retentat	72.3 ± 2.4
BPH 3 kDa permeat	98.8 ± 0.6

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizatı; KPH: Kaşar PAS hidrolizatı; BPH: Beyaz PAS hidrolizatı.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Sonuçlar değerlendirildiğinde ay çekirdeği örneğinde en yüksek biyoaktif özelliğe sahip örnek 10 kDa permeat olarak gözlemlenmiştir. Yüksek ACE ve DPP-IV inhibisyon değeri gösteren fraksiyonların tez konusu dahilindeki gıdalara eklenmesi sonucunda bu gıdalarda daha yüksek ACE ve DPP-IV inhibisyon değeri elde edilmiştir.

4.4. Biyoaktif Peptit Fraksiyonlarının Ürün Geliştirme Denemelerinde Değerlendirilmesi ve Depolama Testleri

Gıda ürünleri formülasyon reçetelerinin oluşturulması için denemeler yapıldıktan sonra peptit fraksiyonları içeren makarna, dondurma ve puding örneklerinden depolama sürelerine bağlı olarak periyodik şekilde numuneler alınmıştır. Şekil 4.7’de makarna ürün formülasyonu denemesi içeriğinde makarna yapma makinesinde üretilen spagetti türü makarna örneği gösterilmektedir. Makarna türü seçiminde yüzey alanı daha düşük olması ve büyüklük bakımından homojen bir örnekleme yapılabilmesi amacıyla penne türü makarna seçilmiştir. Bir çalışmada, sindirim simülasyonu sonrasında analiz edilen spagetti ve penne türü makarna örnekleri karşılaştırıldığında spagettinin toplam yüzey alanının penneye oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak kuskus ve ekmek ile karşılaştırıldığında spagetti ve penne arasında istatistiksel olarak fark gözlemlenmemiştir (Vanhatalo vd., 2021).

Penne türü makarna örneğinin kontrol numunelerinin kurutma aşaması Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekil 4.9’da %2 veya 5 beyaz PAS protein hidrolizat fraksiyonu eklenmiş makarna örnekleri verilmiştir. Oda sıcaklığında raf ömrü 6 ay olan kurutulmuş makarna örnekleri analizlerde kullanılmak üzere plastik paketlerde saklanmıştır. Şekil 4.10’da kurutulmuş makarna örneklerinin analiz öncesi haşlama işleminin görseli bulunmaktadır.



Şekil 4.7: Makarna yapma makinesinde üretilen spagetti türü makarna ürünü.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.8: Makarna örneklerinin kurutulması

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.9: Beyaz peynir altı suyu protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%2 veya 5) makarna örnekleri.

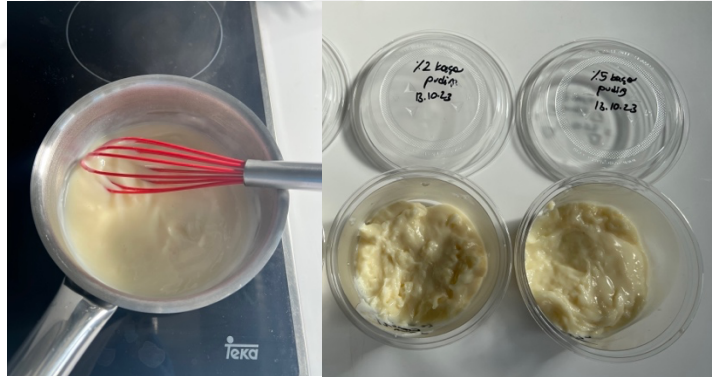
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.10: Pişirme işlemi uygulanan makarna örneği.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Şekil 4.11’de %2 veya 5 kaşar PAS protein hidrolizat fraksiyonu eklenmiş puding yapım aşaması ve +4°C ortamda plastik kaplarda saklanan örnekler verilmektedir.



Şekil 4.11: Kaşar peynir altı suyu protein hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%2 veya 5) puding yapım aşaması ve örnekleri.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Puding formülasyon denemelerinde kontrol ve %1 veya 2 sıvı ile liyofilize protein hidrolizatı içeren örnekler Şekil 4.12’de verilmiştir. Elde edilen hidrolizat fraksiyonlarının pratikte daha uygun görülmesi üzerine tüm gıda örneklerine sıvı ekleneceği kararı verilmiştir. Kaşar PAS hidrolizat eklenen ürün denemeleri ise Şekil 4.13’te verilmiştir.



Şekil 4.12: İki farklı formülasyon uygulanmış ve liyofilize APH eklenmiş (%0-2) pudingleri.

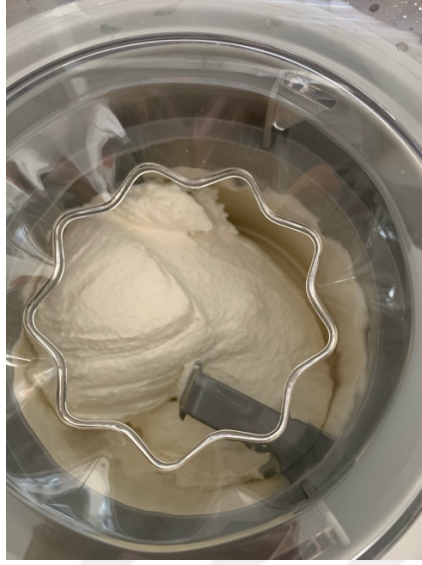
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.13: Kaşar peynir altı suyu hidrolizat 10 kDa fraksiyonu eklenmiş (%0-5) puding örnekleri.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kontrol dondurma örneği Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Bu numunelere %2 ve 5 oranında ay çekirdeği ile kaşar ve beyaz PAS hidrolizatlarının 10 kDa fraksiyonu eklenip 6 ay boyunca -20°C 'de saklama deneyi yürütülmüştür. Raf ömrü boyunca toplamda 6 örnek toplanmıştır.



Şekil 4.14: Dondurma makinesinde hazırlanan kontrol dondurma örneği.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Şekil 4.15'te ACE inhibisyon analizi için hazırlanan HPLC örnekleri verilmiştir. Kontrol numunelere karşılık daha yüksek miktarda fraksiyon eklenmiş numunelerin ACE inhibe edici aktivite daha yüksek bulunmuştur. Tablo 4.7'de kontrol, %2 veya 5 oranlarında hidrolizat eklenen gıda örneklerinin sonuçları verilmiştir. Analizde bazı örneklerin sonucu henüz bulunamamıştır.

Buna ek olarak gıda örneklerine DPP-IV ACE inhibe edici aktivite analizleri yapılmıştır. Analizde sonuç alınamamıştır. Tez çalışmasında DPP-IV inhibisyonu sonucu veren 3 gıda örneği bulunmaktadır. Baz alınan metot, bazı örneklerde sonuç verirken veri alınamayan örneklerde ise metot modifikasyon yoluna gidilmiştir. Modifikasyonlar arasında seyreltme, AE-IP, homojenizasyon, santrifüj, filtreleme, farklı tampon konsantrasyonu kullanma (20-200 mM Tris) gibi uygulamalar bulunmaktadır. Bu modifikasyon yöntemleri tüm gıda örneklerinde denenmiş fakat sonuç alınamamıştır.

Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da depolama sürecindeki puding ve dondurma örneklerinin ACE inhibe edici aktive sonuçları verilmektedir. Puding örneklerinde çoğunlukla %5 eklenen örnekler ACE inhibisyon aktivitesi kontrol ve %2 protein fraksiyonu içeren örnekler ile karşılaştırıldığında daha yüksek değer gösterdiği görülmektedir.

Tablo 4.10’da makarna örneklerinin depolamaya bağlı olarak gösterdiği ACE inhibisyon değerleri (%) verilmiştir. Kontrol ve hidrolizat eklenen makarna örnekleri karşılaştırıldığında, en yüksek biyoaktivite gösteren örneğin %5 kaşar peynir altı suyu hidrolizatı içeren numune olduğu görülmüştür. Bu durumda eklenen protein fraksiyonlarının miktarı artınca gıda örneğinin biyoaktivitesinin arttığı söylenebilmektedir. Depolama süresinde ise ACE inhibe edici aktivite seviyelerinde dalgalanmalar olduğu görülmektedir.

Analiz sonuçlarında lineer bir artış veya azalma görülmemekle beraber bu durumun örnekteki diğer bileşenlerin gösterdiği farklı kimyasal reaksiyonlardan dolayı meydana geldiği yorumlanabilir. Gıda matrisleri yağ, protein, karbonhidrat ve lif gibi bileşenleri içermektedir. Bu bileşenler organik ve inorganik yapıları oluşturduğundan dolayı hedef analitleri aynı anda uzaklaştırabilir veya mobil fazları etkileyebilmektedir. Örneğin gıda içerisindeki yağlar HPLC’de yüksek pikler vermeye sebep olabilmekle beraber ayrıca kolonun etkinliğini de azaltabilmektedir. Gıda matrislerinde bulunabilen flavonoid, antosiyanin, karotenoid gibi bileşikler kolaylıkla ışınları absorbe ederek HPLC’de gelen piklerin dışında gürültü olarak gözükülebilmektedirler. Bu gürültü ise piklerin doğru alınamamasına neden olmaktadır. Ayrıca gıda içerisinde protein ve polisakkaritler analitler ile non kovalent bağ yapması sonucu hidrojenlerin bağlanması veya elektrostatik etkileşimlerin gerçekleşmesi dolayısıyla doğru sonuçların alınamaması muhtemel olmaktadır. Ek olarak, hazırlanan gıda örneklerin katı olması sebebiyle çok derişik ve homojen olmayan karışımlar hazırlanarak saf olmayan numuneler olması dolayısıyla sonuç alınamayabilmektedir.



Şekil 4.15: ACE önleyici aktivite analizi için hazırlanmış yoğurt, dondurma ve puding HPLC örnekleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.5: Kontrol ve ay çekirdeği protein hidrolizatı eklenmiş gıda örneklerinin DPP-IV inhibisyon değerleri (%)

Örnek	% DPP-IV inhibisyon
Kontrol puding	11.8 ± 2.4
%2 APH puding	19.8 ± 12.7
%5 APH dondurma	4.9 ± 4.4

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizatı.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.6: Puding örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)

Örnek	Süre (2 ay)					
	1. Numune	2. Numune	3. Numune	4. Numune	5. Numune	6. Numune
Kontrol	15.7 ± 0.4	12.4 ± 1.1	29.5 ± 1.2	33.5 ± 0.5	64.1 ± 6.2	-
2% APH	56.6 ± 1.7	66.9 ± 7.4	41.1 ± 5.0	34.5 ±	-	64.9 ± 4.3
5% APH	38.3 ± 0.0	-	51.6 ± 8.4	47.6 ± 4.4	-	58.4 ± 0.2
2% Kaşar	69.5 ± 0.4	12.6 ± 3.6	12.7 ± 0.5	23.9 ± 3.1	24.6 ± 0.6	21.0 ± 2.4
5% Kaşar	78.0 ± 1.2	31.6 ± 2.9	35.9 ± 1.1	33.3 ± 1.9	33.5 ± 0.8	31.8 ± 2.1
2% Beyaz	52.2 ± 7.9	-	-	-	-	-
5% Beyaz	59.9 ± 5.2	-	-	-	-	-

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizati.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.7: Dondurma örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)

Örnek	Süre (6 ay)					
	1. Numune	2. Numune	3. Numune	4. Numune	5. Numune	6. Numune
Kontrol	33.8 ± 6.8	44.5 ± 5.6	23.0 ± 2.8	64.1 ± 6.2	86.0 ± 3.5	89.6 ± 4.7
2% APH	69.6 ± 0.2	20.9 ± 0.7	31.6 ± 5.2	15.2 ± 1.7	-	-
5% APH	46.0 ± 6.9	48.5 ± 5.6	22.3 ± 2.6	29.0 ± 5.1	19.6 ± 0.4	27.0 ± 6.1
2% Kaşar	26.1 ± 0.1	25.7 ± 1.7	23.2 ± 0.2	-	-	-
5% Kaşar	41.5 ± 1.8	42.5 ± 1.8	49.6 ± 0.7	-	-	-
2% Beyaz	27.1 ± 1.7	28.0 ± 1.8	26.0 ± 1.3	-	-	-
5% Beyaz	48.5 ± 3.0	52.9 ± 0.1	53.4 ± 0.8	-	-	-

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizati.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.8: Makarna örneklerinin depolama ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (%)

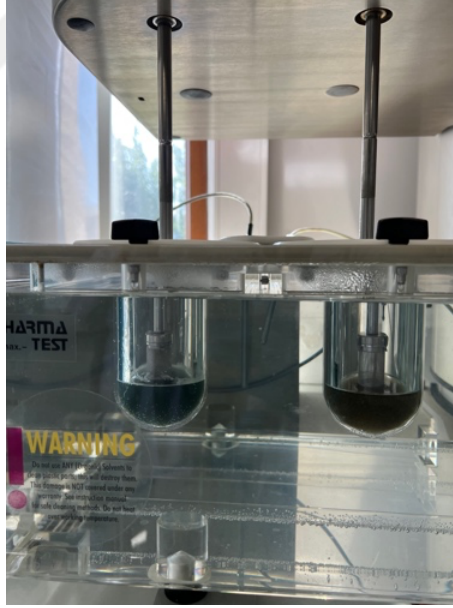
Örnek	Süre (6 ay)	
	1. Numune	6. Numune
Kontrol	12.0 ± 8.7	9.5 ± 3.1
2% APH	-	14.7 ± 3.6
5% APH	-	28.4 ± 1.3
2% Kaşar	20.4 ± 2.4	44.8 ± 4.8
5% Kaşar	32.8 ± 3.1	47.1 ± 2.5
2% Beyaz	14.8 ± 1.0	12.6 ± 2.6
5% Beyaz	35.6 ± 4.7	45.9 ± 0.8

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizati.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur

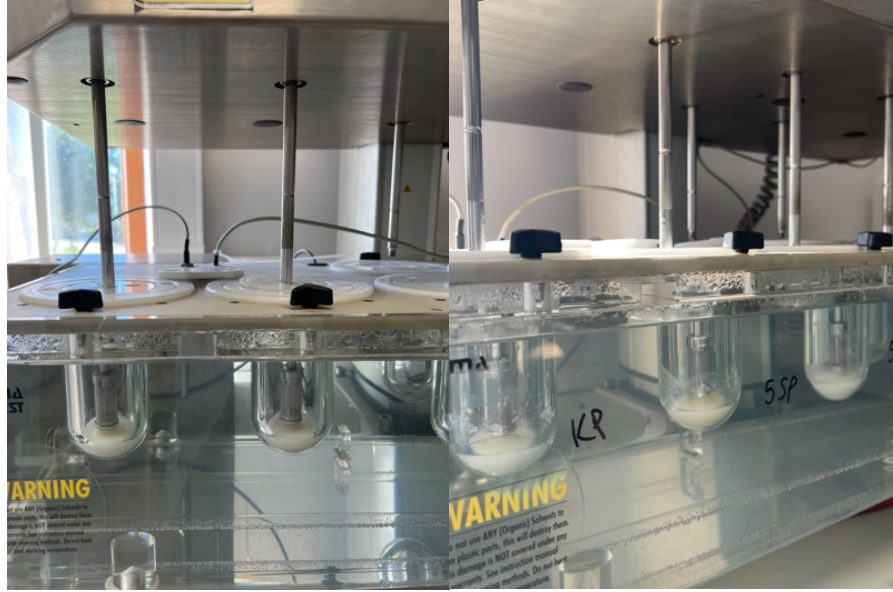
4.5. Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Analizleri

Daha önce bahsedilen Şekil 3.2'deki iş akışına uygun olarak yapılan sindirim simülasyonunda ay çekirdeği hidrolizatı ile kontrol eklenen numunelere %2 veya 5 ay çekirdeği ve peynir altı suyu hidrolize fraksiyonları eklenmiştir. Puding, dondurma ve makarna örnekleri için Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de hidrolizat ve örnek gıdaların sindirim simülasyonu görülmektedir. Şekil 4.18'de sindirimi tamamlanmış santrifüj sonrası faz ayrımı görülen kontrol ve %5 APH eklenmiş dondurma örnekleri gösterilmiştir. Şekil 4.19'da sindirimi tamamlanmış kontrol ve hidrolizat fraksiyonu eklenmiş makarna ve dondurma örnekleri verilmiştir. Makarna örneklerinde içerdiği karbonhidrat ve liften dolayı santrifüj sonrası ayırım daha kolay olurken, dondurma örneklerinde yağdan dolayı daha zor faz ayrımı olmuştur. Sindirimi yapılan örneklerde biyoaktivite analizlerinde daha önce de bölüm 4.4'te bahsedilen sebeplerden dolayı sonuç elde edilememiştir.



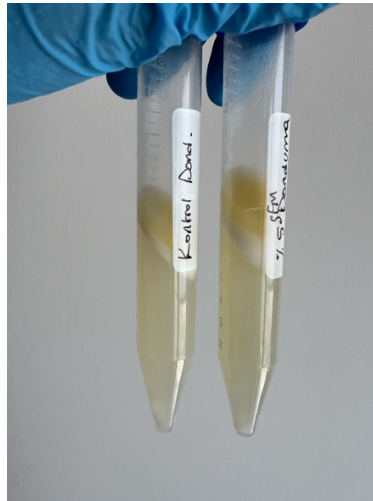
Şekil 4.16: Ay çekirdeği protein Alcalase hidrolizatının *vitro* sindirim simülasyonu.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



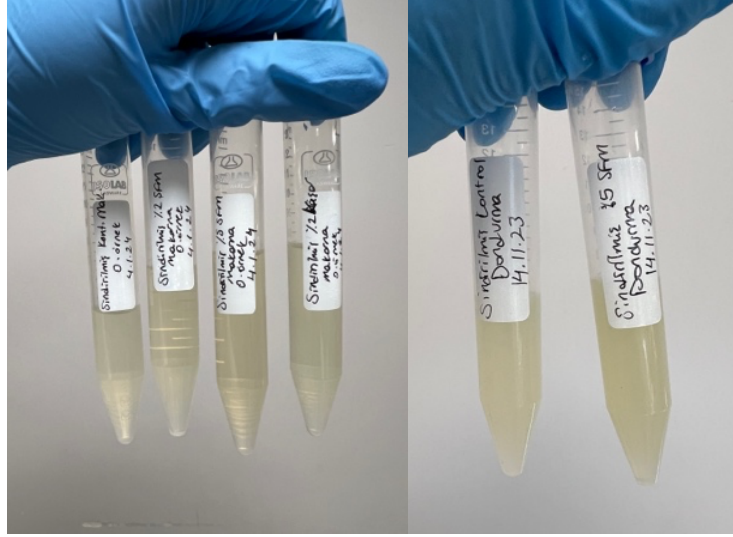
Şekil 4.17: Ay çekirdeği protein hidrolizat fraksiyonu eklenmiş (%0-5) dondurma ve puding *in vitro* sindirim simülasyonu.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.18: Sindirimi tamamlanmış santrifüj sonrası faz ayrımı görülen APH eklenmiş (%0-5) dondurma örnekleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.19: Simüle edilmiş sindirim prosesleri tamamlanmış kontrol ve hidrolizat fraksiyonu eklenmiş makarna ve dondurma örnekleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.6. LC-MS/MS Sonuçları

Tablo 4.9 ve 4.10’da ay çekirdeği, kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizatlarının 10 kDa permeat fraksiyonları ile zenginleştirilmiş dondurma örneklerine ait LC-MS/MS analiz sonuçları verilmiştir. Tabloda numunede belirlenen peptidin kütlesi, pozisyonu, peptid sekansı ve kaynaklandığı protein verilmektedir. Ay çekirdeği hidrolizatı içeren dondurmada yapılan analiz sonucu içerisinde putative glutelin tip B1, albümin-8 öncü (metionince zengin 2S protein, SFA8) ve 11S globülin tohum depo protein G3 olduğu bulunmuştur. Kalitatif bir çalışmada, dominant bir endosperm proteini olan glutelinin pirinçte olduğu gözlemlenmiştir (Satturu & Durgarani, 2016).

İmmüoglobulin E yapısını tutan proteinler, ay çekirdeğinde 10 ile 50 kDa olarak bulunmuş ve albümin 2S proteini 16 kDa büyüklüğünde analiz edilmiştir (Kelly vd., 2000). Dondurmaya eklenen ay çekirdeği protein hidrolizat fraksiyonununun 10 kDa permeatı olması dolayısıyla 10 kDa’dan küçük bileşenleri içerdiği söylenebilir.

Globulin depo proteinlerinden 11S, bir örnekte immüno gold etiketleme yöntemi ile susam tohumlarının tüm protein yapılarında 2S albümin ve 7S globülinler ile beraber bulunduğu görülmüştür (Tai vd., 2001).

Tablo 4.9: Ay çekirdeği hidrolizatı 10 kDa permeal fraksiyonu (%5) eklenen dondurma örneği LC-MS/MS analizi

Kütle (Da)	Pozisyon	Peptit Sekansı	Protein
1301.5595	418-427	KNNRMETMMF	Putative glutelin type-B 1
1090.1759	25-33	QQTQNQCQI	
924.0274	123-129	QDRHQKI	
803.7807	150-156	NDGQEEI	
749.8366	105-111	PGCPETF	
719.8108	133-138	REGDMI	
663.6391	163-168	DSTNEV	
620.6629	272-276	SRPDF	
561.6444	71-74	RHHI	
1085.1596	41-50	GRGRTESGKY	
896.0592	97-104	DEKCMCPA	
803.9348	116-121	RMRDQV	
734.7791	51-56	QQMEEA	
675.7571	110-114	NEPMW	
524.7525	106-109	MMML	
1323.3445	116-129	SGEGGRRGGEGTF	11S globulin seed storage protein G3
1152.1916	251-260	QGQNDQRGHI	
964.0055	178-184	DENQRRF	
851.9788	101-107	PGCRRTY	
730.7759	92-98	PSSREGV	
614.6965	84-89	PTSTPL	
562.5340	243-247	DQETA	

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizat 10 kDa permeat fraksiyonu eklenen dondurmada ise α -laktalbumin, albümin (BSA) ve β -laktoglobulin peptit sekansları tespit edilmiştir. Örneğin, peynir altı suyu hidrolizatı moleküler ağırlığı 300 ile 1400 Da arasında görülürken peynir altı suyu peptitlerinin çoğunlukla 1000 Da'nın altında olduğu görülmüştür (Li-jun vd., 2008). 1400 Da ve altındaki kütlelerde proteinlerin bulunduğu (Tablo 4.10) gözlemlenmektedir.

Ay çekirdeği hidrolizat fraksiyonunun LC-MS/MS ile tespit edilen peptit sekansları Ek 5'te, aynı örneğin ACE ve DPP-IV inhibe edici peptitlerin *in silico* karakterizasyonları ise sırasıyla Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.10: Kaşar ve beyaz peynir altı suyu hidrolizatı 10 kDa permeatı (%5) eklenen dondurma örneği LC-MS/MS analizi

Kütle (Da)	Pozisyon	Peptit Sekansı	Protein
1357.41	80-91	CKDDQNPSSNI	Alpha-lactalbumin
969.91	62-69	QNNDSTEY	
598.67	95-99	SCDKF	
578.68	23-27	TKCEV	
1041.16	265-273	HKECCHGDL	Albumin (BSA)
1013.02	128-136	SHKDDSPDL	
935.12	299-306	KECCDKPL	
881.95	412-418	KQNCQF	
829.90	540-546	PDTEKQI	
727.82	167-171	RRHPY	
709.80	487-492	HEKTPV	
665.74	153-157	DEKKF	
621.70	56-60	QQCPF	
574.67	547-551	KKQTA	
571.68	218-221	RQRL	
542.63	594-598	EGPKL	
518.52	195-199	EDKGA	
855.94	63-70	KPTPEGDL	Beta-lactoglobulin
757.81	173-178	EEQCHI	
701.73	128-133	EPEQSL	
653.72	122-127	CMENSA	
602.64	104-108	NENKV	
600.67	140-144	RTPEV	
515.65	84-87	QKKI	

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.11: Ay Çekirdeği Protein Fraksiyonlarında Potansiyel ACE İnhibe Edici Peptitlerin *In Silico* Karakterizasyonu

Sekans	PeptideRanker Puanı	A	B	Biyoaktivite	A/B
HRRF	0.862692	0.5	0.003624	ACE inhibitör	137.9633
SRPDF	0.849915	0.4	0.001662	ACE inhibitör	240.685
GMGCCRA	0.735746	0.4286	0.000442	ACE inhibitör	968.8903
MSQPCQM	0.685512	0.1429	0.000239	ACE inhibitör	598.2794
QPQGL	0.612495	0.8	0.000441	ACE inhibitör	1812.336
PGCRRTY	0.538868	0.2857	0.000543	ACE inhibitör	525.9103
QGRGY	0.526046	0.8	0.001209	ACE inhibitör	661.9368
MMSTL	0.500033	0.4	0.049993	ACE inhibitör	8.001106

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.12: Ay Çekirdeği Protein Fraksiyonlarında Potansiyel DPP-IV İnhibe Edici Peptitlerin *In Silico* Karakterizasyonu

Sekans	PeptideRanker Puanı	A	B	Biyoaktivite	A/B
QPQGL	0.612495	0.8000	0.00008	Dipeptidil peptidaz IV inhibitör	10460.12
SRPDF	0.849915	0.2000	8.93E-05	Dipeptidil peptidaz IV inhibitör	2240.00
MMSTL	0.500033	0.4000	0.00215	Dipeptidil peptidaz IV inhibitör	186.00

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada endüstride yan ürün olarak üretilen soğuk pres ay çekirdeği keki ile kaşar ve beyaz peynir altı suyu biyoaktif özellik gösteren protein hidrolizat fraksiyonlarının üretimi ve gıda uygulamalarında gösterdiği potansiyel etki araştırılmıştır.

Soğuk pres ay çekirdeği keki protein izolasyonunda AE-IP yöntemi ile liyofilizasyon sonrasında toz izolat elde edilmiştir. Peynir altı suları hacmen 30 kat ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edildikten sonra tüm örnekler Alcalase ve Flavourzyme proteaz enzimleriyle muamele edilerek hidrolizat haline getirilmiştir. Hidrolizatlar ultrafiltrasyon membranlarından geçirilerek her fraksiyonun çözünürlük ve biyoaktif özellikleri araştırılmıştır.

En yüksek biyoaktif özellik gösteren 10 kDa permeat fraksiyonları seçilerek 3 farklı depolama koşuluna sahip gıda örneklerine uygulanmıştır. Puding, dondurma ve makarna örneklerinde %0, 2 ve 5 oranlarında ay çekirdeği ve PAS peptit fraksiyonları eklenerek depolama ve sindirim süresince potansiyel biyoaktivite değişimleri araştırılmıştır.

Hidrolizat, peptit fraksiyonları ve toplanan gıda örnekler üzerinde ACE ve DPP-IV önleyici biyoaktivite testleri uygulanmıştır. Biyoaktivite testleri sonucunda ay çekirdeği, kaşar ve beyaz PAS fraksiyonu ACE inhibisyon değerleri sırasıyla %96.3, %98.2 ve %100.0, DPP-IV inhibisyon değerleri ise sırasıyla %70.6, %71.1 ve %72.6 olarak bulunmuştur. Gıda örnekleri depolama numunelerinin biyoaktivite analizlerinde ise puding örneğinde ay çekirdeği hidrolizat eklenen numuneler diğerlerine nazaran daha yüksek inhibisyon değerleri göstermiştir. Dondurma depolama numunelerinde ise kontrol dondurma en yüksek inhibisyon değerleri bulunmuştur. Makarnada %5 kaşar ve beyaz hidrolizat eklenen numuneler %32.8-47.1 aralığında ACE inhibisyonu göstermiştir. Yapılan LC-MS/MS analizleri sonucunda

ay çekirdeği fraksiyonunda inhibitör peptitler olarak B1, SFA8 ve G3 proteinlerin sekansları bulunmuştur. Beyaz ve kaşar PAS fraksiyonlarında α -laktalbumin, albümin ve β -laktoglobulin peptitlerinin sekansları tespit edilmiştir. Gıda örneklerine eklenen ay çekirdeği keki ile beyaz ve kaşar PAS biyoaktif peptitler içermesi ile gıda endüstrisinde önemli bir kaynak olduğunu göstermiştir. İleri çalışmalarda DPP-IV önleyici aktivite analizlerinde çeşitli gıdalara uygulanabilir farklı metotlar geliştirilebilir.

Günlük tüketilen gıdaların biyoaktif özelliklerinin artırılması, fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi ve üretiminin artırılması insan sağlığının geleceği açısından önemli bir role sahip olmaktadır. Tüketici bilincinin artması ve üretimin daha fazla artarak yaygınlaşması endüstriyel açıdan olumlu bir etkiye sahip olma potansiyeli göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Akılhoğlu, H. G., & Yalçın, E. (2010). *TAHİL PROTEİN HİDROLİZATLARININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ*. 35(3), 227-233.
- Ay, C., & Şanlı, T. (2018). Süt Ürünlerinde Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu ve Fonksiyonel Özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 115-120. <https://doi.org/10.25308/aduziraat.340581>
- Bacenetti, J., Bava, L., Schievano, A., & Zucali, M. (2018). Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment. *Journal of Food Engineering*, 224, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.018>
- Bozer, P. (2021). *Durum ve Tahmin: Ayçiçeği* (345). TARIMSAL EKONOMİ ve POLİTİKA GELİŞTİRME ENSTİTÜSÜ. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporları/2021%20Durum-Tahmin%20Raporları/Ayçiçeği%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202021-345%20TEPGE.pdf>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Cederberg, C., & Sonesson, U. (2011). *Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention; study conducted for the International Congress Save Food! at Interpack 2011, [16 - 17 May], Düsseldorf, Germany* (J. Gustavsson,

- Ed.). International Congress Save Food!, Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Cemiloğlu, M. (2019). *Peynir altı suyundan farklı tekniklerle protein konsantrasi ürünlerinin eldesi* [masterThesis, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı]. <http://openaccess.izu.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12436/2240>
- Chen, G. Q., Qu, Y., Gras, S. L., & Kentish, S. E. (2023). Separation Technologies for Whey Protein Fractionation. *Food Engineering Reviews*, 15(3), 438-465. <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09330-2>
- Clef, E., & Kemper, T. (2015). *Sunflower Seed Preparation and Oil Extraction* (ss. 187-226). <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50014-3>
- Contreras, M. del M., Sevilla, M. A., Monroy-Ruiz, J., Amigo, L., Gómez-Sala, B., Molina, E., Ramos, M., & Recio, I. (2011). Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal*, 21(7), 470-476. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.004>
- Çakmakçı, S., Cantürk, A., & Çakır, Y. (2017). Peynir Üretimi İçin Sütü Pıhtılaştırıcı Enzimlere Genel Bir Bakış ve Güncel Gelişmeler. *Akademik Gıda*, 396-408. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.370264>
- Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Day, L., Cakebread, J. A., & Loveday, S. M. (2022). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 428-442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>
- Durham, R. J., & Hourigan, J. A. (2007). Waste management and co-product recovery in dairy processing. İçinde *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing* (ss. 332-387). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845692520.4.332>
- Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>

- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. İçinde J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (ss. 571-607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Ghosh, B. C., Prasad, L. N., & Saha, N. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1476-1483. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z>
- Göksu, A. G., Çakır, B., & Gülseren, İ. (2022). Hazelnut peptide fractions preserve their bioactivities beyond industrial manufacture and simulated digestion of hazelnut cocoa cream. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 161, 111865. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111865>
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Raghava, G. P. S. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS One*, 8(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Güzeler, N., Esmek, E. M., & Kalender, M. (2017). Peyniraltı Suyu ve Peyniraltı Suyunun İçecek Sektöründe Değerlendirilme Olanakları. *Çukurova Tarım Gıda Bil. Der.*, 32(2), 27-36.
- Hadidi, M., Aghababaei, F., & McClements, D. J. (2024). Sunflower meal/cake as a sustainable protein source for global food demand: Towards a zero-hunger world. *Food Hydrocolloids*, 147, 109329. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109329>
- Hayes, A., & Cribb, P. J. (2008). Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(1), 40-44. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f2a57d>
- Issaq, H. J., Conrads, T. P., Janini, G. M., & Veenstra, T. D. (2002). Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis*, 23(17), 3048-3061. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200209\)23:17<3048::AID-ELPS3048>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200209)23:17<3048::AID-ELPS3048>3.0.CO;2-L)

- Jia, L., Wang, L., Liu, C., Liang, Y., & Lin, Q. (2021). Bioactive peptides from foods: Production, function, and application. *Food & Function*, 12(16), 7108-7125. <https://doi.org/10.1039/d1fo01265g>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. <https://doi.org/10.1021/jf990146l>
- Karefyllakis, D., van der Goot, A. J., & Nikiforidis, C. V. (2019). Multicomponent emulsifiers from sunflower seeds. *Current Opinion in Food Science*, 29, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.005>
- Kelly, J. D., Hlywka, J. J., & Hefle, S. L. (2000). Identification of sunflower seed IgE-binding proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 121(1), 19-24. <https://doi.org/10.1159/000024293>
- Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012>
- Koyama, M., Hattori, S., Amano, Y., Watanabe, M., & Nakamura, K. (2014). Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: A new approach to estimating ACE-inhibitory activity. *PloS One*, 9(9), e105802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105802>
- Li-jun, L., Chuan-he, Z., & Zheng, Z. (2008). Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Processing*, 86(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.007>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Maestri, E., Pavlicevic, M., Montorsi, M., & Marmiroli, N. (2019). Meta-Analysis for Correlating Structure of Bioactive Peptides in Foods of Animal Origin with Regard to Effect and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 3-30. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12402>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>

- Mooney, C., Haslam, N. J., Pollastri, G., & Shields, D. C. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045012>
- Mukherjee, P., Raj, N., & Sivaprakasam, S. (2023). Harnessing valorization potential of whey permeate for D-lactic acid production using lactic acid bacteria. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05038-3>
- Nongonierma, A. B., Mazzocchi, C., Paoella, S., & FitzGerald, R. J. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 94, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.004>
- Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., & Baptista, J. (2017). *Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant Properties, Phenolic Content and Amino Acid Profiles of Fucus spiralis L. Protein Hydrolysate Fractions*. 15(10), 311. <https://doi.org/10.3390/md15100311>
- Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>
- Patil, S. P., Goswami, A., Kalia, K., & Kate, A. S. (2020). Plant-Derived Bioactive Peptides: A Treatment to Cure Diabetes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 955-968. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09899-z>
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J., & Guadix, E. M. (2020). Evaluation of the bioactive potential of foods fortified with fish protein hydrolysates. *Food Research International*, 137, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109572>
- Satturu, V., & Durgarani, Ch. V. (2016). *Physiochemical and Functional Characterization of a Dominant Grain Endosperm Protein Called Glutelin in Rice (Oryza Sativa L.) using in Silico Methods* *Physiochemical and Functional Characterization of A Dominant Grain Endosperm Protein Called Glutelin in Rice (Oryza Sativa L.) using in Silico Methods*.
- Sheih, I.-C., Fang, T. J., & 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.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.019>
- Soltani, M., Say, D., & Guzeler, N. (2017). *Functional Properties and Nutritional Quality of Whey Proteins*. 12.
- Şimşek, Ş. (2022). Ayçiçek Küspesinden Elde Edilen Protein Hidrolizatlarının Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim ve Dipeptidil Peptidaz-IV İnhibisyon Aktiviteleri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i5.918-924.4959>
- Tai, S. S. K., Lee, T. T. T., Tsai, C. C. Y., Yiu, T.-J., & Tzen, J. T. C. (2001). Expression pattern and deposition of three storage proteins, 11S globulin, 2S albumin and 7S globulin in maturing sesame seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(11), 981-992. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01314-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01314-6)
- Takahashi, Y., Kamata, A., & Konishi, T. (2021). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from salmon milt and their effects on postprandial blood glucose level. *Fisheries Science*, 87(4), 619-626. <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01530-9>
- Tsakali, E., Petrotos, K., D'Alessandro, A., & Goulas, P. (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. İçinde *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry 2010, FOODSIM 2010*.
- Tu, J., Cheng, P., Brennan, M. A., & Brennan, C. S. (2023). Chapter 2—Importance and nutritive value of plant proteins in human diet. İçinde Z. F. Bhat, J. D. Morton, A. E.-D. A. Bekhit, & H. A. R. Suleria (Ed.), *Processing Technologies and Food Protein Digestion* (ss. 27-49). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95052-7.00004-2>
- TÜİK. (2019). *Süt ve Süt Ürünleri Üretimi*. Türkiye İstatistik Kurumu. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiM8K_C3q-EAxXNbPEDHa9eD1sQFnoECBEQAQ&url=https%3A%2F%2Fdata.tuik.gov.tr%2FBulten%2FDownloadFile%3Fp%3DxitQKbeBFqcLzthXKyk2bIZKdy1fLSbM4hxcIPpUpdb%2FYVXzHuT98VTNf2cyKDUWpBHq5pyYaRq4xYHJU4ip3tBl6sXGc7UF%2FHESFZDqCLg%3D&usg=AOvVaw0c6QiYar9hTGg3W4qwZx27&opi=89978449

- TÜİK. (2023). *Tahullar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarları 2023-2024*. Türkiye İstatistik Kurumu.
- USDA. (2023). *Oilseeds: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>
- Vanhatalo, S., Dall'Asta, M., Cossu, M., Chiavaroli, L., Francinelli, V., Pede, G. D., Dodi, R., Närväinen, J., Antonini, M., Goldoni, M., Holopainen-Mantila, U., Cas, A. D., Bonadonna, R., Brighenti, F., Poutanen, K., & Scazzina, F. (2021). Pasta Structure Affects Mastication, Bolus Properties, and Postprandial Glucose and Insulin Metabolism in Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*, *152*(4), 994-1005. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab361>
- Villanueva, A., Clemente, A., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites*, *50*(6), 472-476. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i6.697>
- WHO. (2022). *Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2022*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240047761>
- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, *7*(3), 1251-1265. <https://doi.org/10.1039/C5FO01530H>
- Yamamoto, N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Peptide Science*, *43*(2), 129-134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<129::AID-BIP5>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<129::AID-BIP5>3.0.CO;2-X)
- Zandona, E., Blažić, M., & Režek Jambrak, A. (2021). Whey Utilization: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technology and Biotechnology*, *59*(2), 147-161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
- Zhao, L., Gao, P., Zhang, Y., Wang, X., lu, S., Yue, C., Bai, C., Wu, W., Zhang, Y., & Zhao, Z. (2024). Measurement of degree of hydrolysis and molecular weight distribution of protein hydrolysates by liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, *268*, 125347. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125347>

EKLER

EK1: Kjeldahl Protein Tayini Cihazı



Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

EK2: Ay ekirdeği Protein Hidrolizatı ve Fraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği ve Antioksidan Aktiviteleri

Örnek	TPC (GAE, mg/100 g)	DPPH (TE mg/ 100 g)
APH	10.54 ± 0.2	6.84 ± 0.2
APH 10 kDa retentat	17.81 ± 0.0	10.86 ± 0.2
APH 10 kDa permeat	20.92 ± 0.3	4.47 ± 0.3
APH 3 kDa retentat	5.40 ± 0.1	5.28 ± 0.0
APH 3 kDa permeat	20.49 ± 0.1	4.10 ± 0.0

APH: Ay ekirdeği proteini hidrolizatı; TPC: Toplam fenolik içerik; DPPH: Antioksidan aktivitesi; GAE: gallik asit; TE: Troloks eşdeğeri.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

EK3: Ay Çekirdeği Hidrolizat Fraksiyonlarının 3 kDa Ultrafiltrasyon Membranından Geçme Sürelerine Göre Hidroliz Dereceleri

Örnek	HD (%)
APH	16.35 ± 1.0
APH 3 kDa permeat 10. dk	6.66 ± 0.1
APH 3 kDa permeat 20. dk	0.25 ± 0.2
APH 3 kDa permeat 30. dk	8.91 ± 1.9
APH 3 kDa permeat 40. dk	10.56 ± 0.1
APH 3 kDa permeat 50. dk	1.87 ± 1.4
APH 3 kDa permeat 60. dk	9.44 ± 0.3

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizatı; HD: Hidroliz derecesi.

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

EK4: Ay Çekirdeği Hidrolizat Fraksiyonlarının 3 kDa Ultrafiltrasyon Membranından Geçme Sürelerine Göre DPP-IV ve ACE İnhibisyonları

Örnek	DPP-IV inhibisyonu (%)	ACE inhibisyonu (%)
APH 3 kDa permeat	75.0 ± 0.3	86.7 ± 2.0
APH 3 kDa permeat 10. dk	79.3 ± 6.0	88.8 ± 2.2
APH 3 kDa permeat 20. dk	74.3 ± 6.5	94.7 ± 5.4
APH 3 kDa permeat 30. dk	68.6 ± 1.4	94.9 ± 6.5
APH 3 kDa permeat 40. dk	85.4 ± 0.3	94.5 ± 1.4
APH 3 kDa permeat 50. dk	86.1 ± 0.6	91.5 ± 5.7
APH 3 kDa permeat 60. dk	79.3 ± 6.0	92.8 ± 1.8

APH: Ay çekirdeği proteini hidrolizatı

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

EK5: Ay ekirdeği Protein Fraksiyonlarının LC-MS/MS ile Belirlenmiş Peptit Sekansları

No	Kütle (Da)	Pozisyon	Peptit sekansı	Protein kaynağı (Ay ekirdeği)
1	1822.88	21-34	RHQQRQQQNQCQL	11S globulin seed storage protein G3, Helianthus annuus
2	899.38	156-163	HNDGNTL	
3	852.41	101-107	PGCRRTY	
4	731.36	92-98	PSSREGV	
5	537.23	60-63	DQQF	
6	824.30	135-141	MSQPCQM	Albumin-8 precursor
7	735.29	51-56	QQMEEA	(Methionine-rich 2S protein)
8	804.33	150-156	NDGQEEI	Putative glutelin type-B 1
9	720.33	133-138	REGDMI	
10	648.29	112-117	QSSQQA	
11	637.29	118-122	EERGF	
12	632.26	338-343	NNEGQA	
13	621.29	272-276	SRPDF	
14	615.34	175-178	HRRF	
15	582.26	384-388	MMSTL	
16	580.28	95-99	QGRGY	
17	563.23	215-219	DQETA	
18	560.26	350-354	QEGQV	
19	542.29	75-79	QPQGL	
20	750.31	108-114	TSEEGDI	Prolamin-like domain-containing protein
21	721.31	145-151	NSTTNA	(Putative prolamin-like domain-containing protein)
22	697.25	83-89	GMGCCRA	
23	650.33	27-32	TNTTTI	
24	605.30	139-144	PPPHSA	
25	605.25	122-127	SDNGNV	
26	583.23	77-81	NGETY	
27	522.22	67-71	CTGEI	

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

ÖZGEÇMİŞ

Sena Nur DUMAN

A. EĞİTİM

Yüksek Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü,
2024, İstanbul

Lisans: İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2020, İstanbul

B. MESLEKİ DENEYİM

2022 Ekim – 2024 Mayıs TÜBİTAK 1001 Bursiyeri

2019 Ağustos – Eylül TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü Laboratuvar Stajyeri

C. SERTİFİKALARI

2024 KOSGEB İleri Girişimcilik Eğitimi

2021 TSC Kariyer Eğitim:

1. ISO 22000 – Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi ISO 22000 – Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi İç Denetçi
2. GMP – İyi Üretim Uygulamaları
3. GLP – İyi Laboratuvar Uygulamaları
4. BRC – İngiliz Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi