



***Spirulina platensis*'TEN ELDE EDİLEN PEPTİTLERİN
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

RIDVAN ARSLAN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK - 2025**

***Spirulina platensis*'TEN ELDE EDİLEN PEPTİTLERİN
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

RIDVAN ARSLAN
ORCID ID: 0000-0002-8834-753X

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SALİH AKSAY
ORCID ID: 0000-0002-6068-6628

MERSİN
OCAK - 2025

ÖZET

***Spirulina platensis*'TEN ELDE EDİLEN PEPTİTLERİN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Protein içeriği yüksek olan *Spirulina platensis*'ten elde edilen biyoaktif peptitler, antihipertansif ve antioksidan özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Bu nedenle, *S. platensis* mikroalginin protein ve protein hidrolizatlarının bazı biyoaktif özellikleri tez kapsamında incelenmiştir.

S. platensis tozundan elde edilen protein konsantresi alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleriyle hidroliz edilmiştir. Elde edilen enzimatik hidrolizatlar ve hidroliz olmamış örnek, *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen hidrolizatların protein içerikleri, hidroliz dereceleri, ACE inhibitör etkileri, antioksidan aktiviteleri (FRAP, DPPH ve ABTS), toplam fenolik madde miktarları, fenolik bileşen profilleri ve peptitlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

Alkalaz (A₀), papain (P₀) ve flavourzyme (F₀) hidrolizatlarının, K₀ örneğine göre hidroliz derecesinde artış olduğu gözlenmiştir. A₀ hidrolizatının hidroliz derecesi %9,18 iken; *in-vitro* sindirim işleminden sonra mide fazında (A-PG) %12,31'e yükseldiği, bağırsak fazında (A-Out) %17,61 ile en yüksek değere sahip olduğu gözlenmiştir.

K₀ diğer tüm örneklerle karşılaştırıldığında en yüksek IC₅₀ değerine (1,34 mg protein/ml) sahip iken, *in-vitro* sindirim işlemi ile elde edilen K-PG ve K-Out örnekleri tüm örnekler arasında sırasıyla 0,09 mg protein/ml ve 0,10 mg protein/ml olarak en düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. ACE inhibitör etkiye sahip K-PG ve K-Out örnekleri, hidroliz olmamış K₀ örneğinden sırasıyla 13,02 ve 14,21 kat daha fazla inhibitör etkisi göstermiştir.

K₀ örneğinde farklı molekül ağırlıklarına sahip peptitler tanımlanırken, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemlerinin etkisi ile moleküler ağırlıkları farklı peptitler tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitler; hidroliz ve *in-vitro* sindirimin aynı aşamalarında tanımlanabildiği gibi farklı aşamalarda açığa çıkıp sonrasında tamamen hidroliz olabildiği de gözlenmiştir.

Spirulina protein hidrolizatlarının; FRAP değerleri 0,82 (F-In) ile 31,87 (K-Out) mg TE/g KM, ABTS-radikal süpürme değerleri 16,42 (F₀) ile 678,61 (A-In) mg TE/g KM arasında, DPPH-radikal aktivite değerleri 0,54 (P-In) ve 4,96 (K-PG) mg TE/g KM arasında değişmiştir.

Bu çalışmanın sonucu, *S. platensis* proteininin iyi bir antihipertansif, antioksidan ve fenolik bileşen kaynağı olduğunu, fonksiyonel gıdalarda ve nutrasötiklerde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, Enzimatik hidroliz, *In-vitro* sindirim, Biyoaktif peptit, ACE inhibitörü.

Danışman: Doç. Dr. Salih AKSAY, Mersin Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF PEPTIDES OBTAINED FROM *Spirulina platensis*

Bioactive peptides obtained from *Spirulina platensis*, which has high protein content, attract great attention due to their antihypertensive and antioxidant properties. Therefore, some bioactive properties of proteins and protein hydrolysates of *S. platensis* microalgae were investigated within the scope of this thesis.

Protein concentrate obtained from *S. platensis* powder was hydrolyzed with alcalase, papain and flavourzyme enzymes. The obtained enzymatic hydrolysates and the unhydrolyzed sample were subjected to in vitro gastrointestinal digestion process. Protein contents of the obtained hydrolysates, degrees of hydrolysis, ACE inhibitory effects, antioxidant activities (FRAP, DPPH and ABTS), total phenolic substance amounts, phenolic component profiles and molecular weights of peptides were determined.

It was observed that the degree of hydrolysis of alcalase (A₀), papain (P₀) and flavourzyme (F₀) hydrolysates increased compared to the K₀ sample. While the degree of hydrolysis of A₀ hydrolysate was 9.18%, it was observed that it increased to 12.31% in the stomach phase (A-PG) after in vitro digestion and had the highest value of 17.61% in the intestinal phase (A-Out).

While K₀ had the highest IC₅₀ value (1.34 mg protein/ml) compared to all other samples, K-PG and K-Out samples obtained by in vitro digestion were found to have the lowest IC₅₀ values among all samples as 0.09 mg protein/ml and 0.10 mg protein/ml, respectively. K-PG and K-Out samples with ACE inhibitory effect showed 13.02 and 14.21 times more inhibitory effect than the non-hydrolyzed K₀ sample, respectively.

While peptides with different molecular weights were identified in the K₀ sample, peptides with different molecular weights were identified due to the effect of enzymatic hydrolysis and in vitro digestion processes. It was observed that the identified peptides could be identified at the same stages of hydrolysis and in vitro digestion, or they could be released at different stages and then completely hydrolyzed.

FRAP values of *Spirulina* protein hydrolysates ranged between 0.82 (F-In) and 31.87 (K-Out) mg TE/g DM, ABTS-radical scavenging values ranged between 16.42 (F₀) and 678.61 (A-In) mg TE/g DM, DPPH-radical activity values ranged between 0.54 (P-In) and 4.96 (K-PG) mg TE/g DM.

The result of this study showed that *S. platensis* protein is a good source of antihypertensive, antioxidant and phenolic compounds and may play an important role in functional foods and nutraceuticals.

Keywords: *Spirulina platensis*, Enzymatic hydrolysis, *In-vitro* digestion, Bioactive peptide, ACE inhibitory.

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Salih AKSAY, Department of Food Engineering, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

“*Spirulina platensis*’ten elde edilen peptitlerin biyoaktif özelliklerinin incelenmesi” başlıklı tez çalışmamın her aşamasında yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, araştırma konumun tüm detayları ile ele alınmasını, düzenlenmesini, değerlendirilmesini sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Salih AKSAY’a teşekkür ederim.

Başta merhum Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ hocamız olmak üzere Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölüm hocalarına, asistanlarına ve idari personellerine almış olduğum eğitime sunmuş oldukları emek ve katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Tez İzleme Komitesi’nde bulunan Prof. Dr. Nüzhet İkbāl TÜRKER ve Prof. Dr. Mustafa Ümit ÜNAL hocalarıma teşekkür ederim.

Dostluklarını ve desteklerini benden esirgemeyerek her zaman yolun sonundaki ışığı hatırlatan sevgili arkadaşlarım Güler ATASOY’a ve Dr. Fırat ÇINAR’a teşekkür ederim.

2008 yılında tanıştığım ve o günden beri bulduğum kayıp ablam olan Sayın Prof. Dr. Ayşe İRMİŞ’e; her fırsatta desteğini gösterdiği, tecrübeleri ile beni yönlendirdiği ve umutlu olmamı sağladığı için teşekkür ederim.

ALATA Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü’nün imkânlarından faydalanmamı sağlayan Gıda Bölüm Başkanı Sayın Dr. Ali TEKİN’e, Dr. Mustafa ÜNLÜ’ye ve Zeynettin BAYSAL’a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamı 2021-2-TP3-4476 numaralı araştırma projesi ile destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)’ne teşekkür ederim. YÖK 100/2000 “Yenilikçi Gıda İşletme Teknolojileri ve Gıda Biyoteknolojisi” öncelikli alanlar doktora bursu kapsamında beni destekleyen Yükseköğretim Kurumu (YÖK)’na teşekkür ederim.

Varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, destek ve sevgilerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

*Annem Latıfa Sultan’a ve Babam Hasan’a
her şey, sizin sayenizde ve siz için*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Mikroalglerin Genel Özellikleri	3
2.2. Mikroalgal Proteinler ve Biyoaktif Özellikleri	5
2.2.1. Fikobiliproteinler	6
2.2.2. Mikroalg Proteinlerinin Biyoaktif Özellikleri	7
2.2.3. Mikroalg Proteinleri İçin Ekstraksiyon Yöntemleri	8
2.3. <i>Spirulina platensis</i>	9
2.4. Biyoaktif Peptitler	11
2.4.1. Biyoaktif Peptitlerin Antihipertansif Özellikleri	13
2.4.2. Biyoaktif Peptitlerin Antioksidan Özellikleri	15
2.4.3. Biyoaktif Peptitlerin Antikanser/Antitümör Özellikleri	16
2.4.4. Biyoaktif Peptitlerin Antidiyabet Özellikleri	17
2.4.5. Biyoaktif Peptitlerin Antimikrobiyal Özellikleri	18
2.5. Biyoaktif Peptitlerin Üretilmesi ve Saflaştırma Yöntemleri	18
2.5.1. Enzimatik Hidroliz	19
2.5.2. Mikrobiyal Fermantasyon	20
2.5.3. Kimyasal sentez	20
2.5.4. Membran Filtrasyonu İşlemi	21
2.5.5. Kromatografik Yöntemler	21
2.6. Proteazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Protein Konsantresi Elde Edilmesi	28
3.2.2. Enzimatik Protein Hidrolizi	29
3.2.3. <i>In-vitro</i> Sindirim ve Biyoerişebilirlik	31
3.2.4. Protein Analizi	32
3.2.5. Hidroliz Derecesi (% HD)	33
3.2.6. Antioksidan Aktivite Analizleri	34
3.2.6.1. Demir (III) iyonu (ferrik) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP)	34
3.2.6.2. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme	35
3.2.6.3. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) (ABTS-radikal süpürme aktivitesi)	36
3.2.7. Toplam Fenolik Madde Analizi	36
3.2.8. ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) İnhibisyon Analizi	37
3.2.9. Fenolik Bileşen Analizi	39
3.2.10. LCMS IT-TOF İle Peptitlerin Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi	42
3.2.11. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
4.1. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi (HD)	45
4.2. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarının ACE İnhibisyon Değerleri	48

	Sayfa
4.3. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarının Antioksidan Aktivite Değerleri	57
4.4. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarının Fenolik Bileşen İçerikleri ve Toplam Fenolik Madde Miktarları	59
4.5. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarında Analiz Edilen Parametreler Arasındaki Korelasyon	62
4.6. <i>Spirulina platensis</i> Protein Hidrolizatlarının LCMS IT-TOF ile Peptitlerin Molekül Ağılıklarının Belirlenmesi	64
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	73
EKLER	89
ÖZGEÇMİŞ	105

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Farklı çalışmalarda kullanılan bazı mikroalg türlerinin kullanım amaçları ve biyoaktif özellikleri	4
Tablo 2.2. Mikroalglerin genel kimyasal bileşimi ve geleneksel gıdalarla karşılaştırılması	6
Tablo 2.3. <i>Spirulina platensis</i> 'in besin içeriği	10
Tablo 2.4. Çeşitli gıdalardan elde edilen biyoaktif peptitler ve biyoaktiviteleri	13
Tablo 2.5. Mikroalglerden elde edilen biyoaktif peptitlerin amino asit dizilimi ve biyoaktiviteleri	15
Tablo 2.6. Proteazların sınıflandırılması	24
Tablo 3.1. Kontrol, inhibitör ve kör örneklerinin içerikleri.	38
Tablo 3.2. HPLC'de belirlenen fenolik standartlara ait alıkonma zamanları ve dalga boyları	40
Tablo 4.1. Seyreltilmiş <i>S. platensis</i> protein hidrolizatlarının % ACE İnhibisyon ve protein içeriği değerleri	50
Tablo 4.2. <i>Spirulina platensis</i> protein hidrolizatlarının antioksidan aktivite değerleri	57
Tablo 4.3. <i>Spirulina platensis</i> protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri ve toplam fenolik madde miktarları	59
Tablo 4.4. <i>Spirulina platensis</i> protein hidrolizatlarının analizleri arasındaki Pearson korelasyon katsayıları (r^2)	62
Tablo 4.5. LCMS IT-TOF ile belirlenen <i>S. platensis</i> peptitlerinin (protein hidrolizatlarının) molekül ağırlıkları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikroalg <i>S. platensis</i> 'in mikroskopik görünümü	10
Şekil 2.2. <i>Spirulina</i> 'dan elde edilen “dihé”	11
Şekil 2.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi	14
Şekil 3.1. <i>S. platensis</i> protein konsantresinin elde edilmesi	29
Şekil 3.2. <i>S. platensis</i> protein hidrolizatı üretimi	30
Şekil 3.3. <i>In-vitro</i> gastrointestinal sindirim modeli	32
Şekil 3.4. Sığır serum albümini (BSA) için kalibrasyon grafiği	34
Şekil 3.5. FRAP yöntemi için trolox kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.6. DPPH yöntemi için trolox kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.7. TEAC yöntemi için trolox kalibrasyon grafiği	37
Şekil 3.8. Gallik asit kalibrasyon grafiği	38
Şekil 3.9. HA ve HHL'e ait HPLC kromatogramı	39
Şekil 3.10. Hippürik asit kalibrasyon grafiği	39
Şekil 3.11. Kateşin standartına ait 240 nm'deki HPLC kromatogramı	41
Şekil 3.12. Gallik asit ve şirinjik asit standartlarına ait 280 nm'deki HPLC kromatogramı	41
Şekil 3.13. Klorojenik asit ve kumarik asit standartlarına ait 320 nm'deki HPLC kromatogramı	42
Şekil 3.14. Mirisetin, kuarsetin ve izoramnetin standartlarına ait 360 nm'deki HPLC kromatogramı	42
Şekil 4.1. <i>S. platensis</i> protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (%HD) değerleri	46
Şekil 4.2. <i>S. platensis</i> protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon (%) değerleri.	48
Şekil 4.3. <i>S. platensis</i> protein hidrolizatlarının protein içeriği ile %İNH değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler.	52
Şekil 4.4. <i>S. platensis</i> protein hidrolizatlarının IC ₅₀ değerleri.	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ACE	Angiotensin-I Converting Enzyme
IC ₅₀	ACE aktivitesinin %50 inhibisyonuna eşdeğer olan protein konsantrasyonu
HD	Hidroliz Derecesi
FRAP	Ferrik indirgeme-antioksidan gücü
DPPH	DPPH-radikal süpürme aktivitesi
ABTS	ABTS-radikal süpürme aktivitesi
TFM	Toplam fenolik madde miktarı
FBT	Fenolik bileşenlerin toplamı
K ₀	Kontrol örneği
K-PG	Kontrol-Mide hidrolizatı
K-Out	Kontrol-İnce bağırsak hidrolizatı
K-In	Kontrol-Dolaşım sistemine geçen hidrolizat
A ₀	Alkalaz hidrolizatı
A-PG	Alkalaz-Mide hidrolizatı
A-Out	Alkalaz-İnce bağırsak hidrolizatı
A-In	Alkalaz-dolaşım sistemine geçen hidrolizat
P ₀	Papain hidrolizatı
P-PG	Papain-Mide hidrolizatı
P-In	Papain-İnce bağırsak hidrolizatı
F ₀	Flavourzyme hidrolizatı
F-PG	Flavourzyme-Mide hidrolizatı
F-Out	Flavourzyme-İnce bağırsak hidrolizatı
F-In	Flavourzyme-dolaşım sistemine geçen hidrolizat
BSA	Sığır serum albümini
TE	Troloks eşdeğeri
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HA	Hippürik Asit
HHL	N-Hippuril-Histidin-Lösün

1. GİRİŞ

Mikroalgler; polisakkaritler, proteinler, lipitler, pigmentler, lifler ve polifenoller gibi bileşikler açısından zengin bir hücre yapısına sahiptirler. Mikroalgler alternatif bir protein kaynağı olduğu için; antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, anti-hipertansif, anti-diyabetik, anti-aterosklerotik, antikoagülan ve anti-mikrobiyal özelliklere sahip biyoaktif peptitler ve diğer proteinli bileşiklere de sahiptirler (Geada vd., 2021). Biyoaktif peptitler, enzimatik protein hidrolizatlarında ve fermente süt ürünleri gibi bazı gıdalarda doğal olarak bulunabilirler. Aynı zamanda, proteinlerin midede sindirimi sırasında da açığa çıkabilirler. Genel olarak, biyoaktif peptitler, hidrolize edilmemiş proteinlerden elde edilmeden önce herhangi bir biyoaktivite göstermeyen, 3-20 amino asitten oluşan bileşiklerdir. Bununla birlikte; bu peptitlerin antihipertansif, antimikrobiyal, antioksidan, kolesterol düşürme, safra asitlerini bağlama gibi biyoaktif özellikleri de bulunmaktadır (Lordan vd, 2011; Ibañez vd., 2012; Raposo vd., 2013). Biyoaktif peptitler farklı protein kaynaklarından elde edilebilirler. En çok incelenen biyoaktif peptit kaynakları; süt, peynir altı suyu, yumurta, balık, deniz ürünleri, soya fasulyesi, pirinç, yer fıstığı, nohut, mısır ve alglerdir (Chalamaiah vd., 2018).

Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler, en çok antihipertansif özellikleri ile bilinirler. Etkileri temel olarak renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde (RAAS) anjiyotensin-I dönüştürücü enzimin (ACE) inhibisyonu şeklindedir. RAAS kan hacminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve insanlarda kan basıncı ve sıvı dengesi düzenlemesinden sorumludur. ACE, anjiyotensin-I'i, güçlü bir vazokonstriktör (damar büzücü) olan anjiyotensin-II'ye dönüştüren bir çinko metaloproteazdır. Anjiyotensin-II'nin oluşumuna neden olan ACE'yi inhibe etmek, kan basıncının düşmesine yol açabilir ve bu durum hipertansiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Peptitlerin yapısı ve bileşimi, ACE inhibisyonunun belirlenmesinde en temel faktörlerdir. En etkili antihipertansif peptitler, Prolin gibi hidrofobik amino asit kalıntıları içerenlerdir (Ejike vd., 2017; Chalamaiah vd., 2018). Günümüzde hipertansiyon tedavisi, antihipertansif ilaçlarla yapılmaktadır. Kaptopril gibi sentetik ACE inhibitörleri sıklıkla hipertansiyonun düşürülmesinde ilaç olarak kullanılır, ancak öksürük ve anjiyo-ödem gibi ciddi yan etkilere neden olabilirler. Gıda peptitlerinin antihipertansif özellikleri geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bu nedenle insan deneklerde kan basıncı ve diğer kalp-damar rahatsızlıklarının azaltılmasında; fizyolojik öneminin saptanması için, mikroalgal peptitlerin diğer gıdalardan alınan peptitlere göre daha fazla değerlendirilmesi gerekir (Ejike vd., 2017).

Mikroalglerden elde edilen antioksidan peptitler, antioksidan yeteneklerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gösterir; öncelikle serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görür, reaktif oksijen türlerini engelleyerek lipitlere, proteinlere ve DNA'ya oluşabilecek oksidatif hasarı önler (López-García vd., 2022). *Chlorella* sp., *Navicula* sp. ve *Spirulina* sp., antioksidan peptitler için yaygın olarak çalışılan mikroalg türleri arasındadır.

Tez çalışmasında, *Spirulina platensis* mikroalginin protein ve protein hidrolizatlarının bazı biyoaktif özellikleri incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; *S. platensis* tozundan alkali

özütleme ve izoelektrik çöktürme yöntemine ile elde edilen protein konsantresi alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen enzimatik hidrolizatlar ve hidroliz olmamış kontrol örneği *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların protein içerikleri, hidroliz dereceleri, ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) inhibisyon etkileri, antioksidan aktiviteleri (FRAP, DPPH ve ABTS) ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Ayrıca hidrolizatların fenolik bileşenleri ve hidrolizatlarda açığa çıkan peptitlerin molekül ağırlıkları da belirlenmiştir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Mikroalglerin Genel Özellikleri

Mikroalgler, embriyofit kara bitkileri ve likenler dışında oksijen üretebilen, fotosentetik tek hücreli organizmalar (Bleakley ve Hayes, 2017). Fotosentez yoluyla büyüyen bu canlılar, boyutları birkaç mikron ile birkaç yüz mikron arasında değişebilen çeşitli basit bitki gruplarıdır (Kim, 2015). Mikroalgler denizlerde, tatlı sularda ve atık sularda küresel olarak yayılmıştır (Dolganyuk vd., 2020). Birçok ekosistemde hayati bir rol oynayan mikroalgler, zengin besin içerikleri sayesinde bulundukları ortamdaki canlıların beslenmesinde önemli rol alırlar (Şahin ve Akyurt, 2010). Biyolojik CO₂/O₂ döngüsünde yer alırlar ve küresel oksijenin yaklaşık %50'sini üretebilirler (Patras vd., 2019). Mikroalgler morfolojik, ekolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler açısından sahip oldukları farklılıklar nedeniyle genetik açıdan oldukça çeşitlidir. Sahip oldukları fotosentetik pigmentler, depo bileşikleri, hücre duvarlarının bileşimi, kamçıların varlığı/yokluğu ve kloroplastların yapısı gibi farklılıklar nedeniyle renklerine göre üç farklı gruba ayrılmışlardır. Bunlar, Phaeophyta (kahverengi algler), Chlorophyta (yeşil algler) ve Rhodophyta (kırmızı algler) şeklindedir (Hayes, 2012). Ayrıca *Spirulina* (*Arthrospira platensis* ve *Arthrospira maxima*) gibi siyanobakteriler veya mavi-yeşil algler (Cyanophyceae) aynı zamanda mikroalg olarak da adlandırılırlar (Kim, 2015).

Mikroalgler göllerde, nehirlerde, haliçlerde, okyanuslarda, buzullarda veya topraklarda bulunabildiği gibi farklı biyoteknolojik yöntemlerle de fotobiyoreaktörlerde yetiştirilebilirler (Richmond ve Hu, 2013). Mikroalgler; proteinler, peptitler, lipitler, çoklu doymamış yağ asitleri, polisakkaritler, vitaminler, mineraller, pigmentler, enzimler, karotenoidler ve fenolik maddeler gibi besin maddesi ve biyoaktif bileşik açısından zengindir. Mikroalglerden elde edilen biyoaktif bileşikler antioksidan, antibakteriyel, antikanser, antihipertansif, antiviral, nöroprotektif ve immünostimüle edici etkiler gösterirler. Bu bileşikler gösterdikleri etkiler nedeniyle eczacılık, tıp, kozmetik, kimya endüstrisi, balık yetiştiriciliği, enerji endüstrisi, yem ve fonksiyonel gıda üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Dolganyuk vd., 2020; Gürlek vd., 2020).

Birçok biyoaktif bileşiğin önemli doğal bir kaynağı olan mikroalgler, geleneksel gıdaların besin değerini artırmak için fonksiyonel bileşenler olarak kullanılırlar. Ayrıca mikroalgler ve mikroalglerden elde edilen preparatlarının kullanılması gıda ürünlerine sağlık açısından faydalı özellikler kazandırmıştır. Bu nedenle, mikroalg bileşenleriyle fonksiyonel beslenmek insanların yaşam kalitesini iyileştirir ve hastalık riskini azaltmıştır (Babich vd., 2022). Mikroalgler gıda takviyesi olarak toz, tablet ve kapsül şeklinde insanlar tarafından tüketilmektedir. Ayrıca makarna, bisküvi, ekmek, yoğurt, çerez, şekerleme, atıştırılmalık ve içecek gibi mikroalg veya mikroalg preparatı içeren fonksiyonel gıdalar da insanlar tarafından tüketilmektedir (Chacón-Lee ve González-Mariño, 2010). Tablo 2.1'de farklı çalışmalarda kullanılan bazı mikroalg türlerinin kullanım amaçları ve biyoaktif özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.1. Farklı çalışmalarda kullanılan bazı mikroalg türlerinin kullanım amaçları ve biyoaktif özellikleri.

Tür	Fonksiyonel Gıda/Ürün	Kullanım Amacı / Biyoaktif Özellik	Kaynak
<i>Chlorella vulgaris</i>	Yağlı kurabiye	Renklendirici	(Gouveia vd., 2007)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i>	Gıda emülsiyonu	Renklendirici, Antioksidan etki	(Gouveia vd., 2006)
<i>Dunaliella salina</i>	Toz <i>Dunaliella</i>	Antioksidan etki	(Murthy vd., 2005)
<i>Isochrysis galbana</i>	Bisküvi	Renklendirici, PUFA açısından zenginleştirme	(Gouveia vd., 2008)
<i>Isochrysis galbana</i> , <i>Diacronema vlkianum</i>	Makarna	Omega-3 yağ asidi açısından zenginleştirme	(Fradique vd., 2013)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Kurabiye ve makarna	Renklendirici, Omega-3 yağ asidi açısından zenginleştirme	(Babuskin vd., 2014)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Sterol ekstraktı	Antikanser etki, Anti-inflamatuar etki	(Sanjeeva vd., 2016)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polisakkarit izolatu	Bağışıklık uyarıcı, Antikanser etki	(Sun vd., 2012) (Gardeva vd., 2009)
<i>Spirulina spp.</i>	<i>Spirulina</i> takviyesi	Bağışıklık güçlendirici, Anti-inflamatuar etki, Antioksidan etki	(Gutiérrez-Rebolledo vd., 2015; Park ve Lee, 2016)
<i>Spirulina platensis</i>	Makarna	Proteince zenginleştirme, Renklendirici, Antioksidan etki	(Zouari vd., 2011; Lemes vd., 2012; Marco vd., 2014; Özyurt vd., 2015)
<i>Spirulina platensis</i>	Yoğurt	Besinsel açıdan zenginleştirme, Renklendirici	(Malik vd., 2013; Arslan ve Aksay, 2021)
<i>Spirulina platensis</i>	Glütensiz ekmek	Proteince zenginleştirme, Renklendirici	(Figueira vd., 2011)
<i>Spirulina platensis</i>	Bebek maması	Besinsel açıdan zenginleştirme	(Sharoba, 2014)
<i>Spirulina platensis</i>	İzole peptitler	Antihipertansif etki	(Lu vd., 2010)
<i>Spirulina spp.</i>	Atıştırmalık	Besinsel açıdan zenginleştirme	(Morsy vd., 2014; Joshi vd., 2014)

Spirulina, *Chlorella*, *Dunaliella* ve *Haematococcus*'ta bulunan biyoaktif mikroalg bileşikler, fonksiyonel gıda formülasyonunda çok sayıda uygulamaya ve faydaya sahiptir. Bu bileşikler, gıda ürünlerinin besin değerini, fonksiyonel özelliklerini, duysal niteliklerini ve sağlık etkilerini artırabilir. Örneğin, *Spirulina*, doğal antioksidanlar ve renklendirici maddeler olarak kullanılabilen karotenoidler, fenolik bileşikler, fikosiyenin ve klorofiller içerir. *Spirulina* ayrıca antikanser, nöroprotektif, probiyotik, anti-inflamatuar ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkilere sahiptir (Bortolini vd., 2022; Siddhnath vd., 2024). *Chlorella*, antioksidan, anti-inflamatuar ve immünomodülatör özellikler gibi insan sağlığını destekleyen ve belirli hastalıkları önleyen besinler ve biyoaktif bileşikler içerir (Bito vd., 2020; Siddhnath vd., 2024). *Dunaliella* kolayca sindirilebilir ve kaliteli temel amino asitler, polisakkaritler ve fenolik bileşikler içerir, bu da onu umut verici bir alternatif prebiyotik kaynağı ve potansiyel bir fonksiyonel besin takviyesi yapar (Ampofo ve Abbey, 2022). *Haematococcus pluvialis* göz, cilt, bağışıklık ve kardiyovasküler sağlığı destekleyen ve iltihabı azaltan güçlü bir antioksidan

olan astaksantin açısından zengindir (Raja vd., 2018). Mikroalglerin bu biyoaktif bileşikleri, belirli sağlık yararları sağlayan yenilikçi fonksiyonel gıda ürünleri geliştirmek için kullanılmaktadır (Siddhnath vd., 2024).

2.2. Mikroalgal Proteinler ve Biyoaktif Özellikleri

Son yıllarda, mikroalgler küresel gıda ve içecek endüstrileri, su ürünleri çiftçiliği, hayvan ve insan beslenmesi için önemli ürünler haline gelmiştir. Bunun nedenlerinden en önemlisi mikroalglerin esansiyel amino asitler ve vitaminler, antioksidanlar, çoklu doymamış yağ asitleri ve mineraller gibi değerli bileşenlerin yanında yüksek protein içeriklerine sahip olmalarıdır. Mikroalg proteinleri günümüzde gıda maddeleri, hayvan ve su ürünleri yemleri, beslenme takviyeleri, ilaçlar ve kozmetikler olarak kullanılmaktadır (Wang vd., 2021).

Mikroalg türlerinin bileşimlerinde belirgin farklılıklar olmasına rağmen, protein her zaman başlıca organik bileşendir, bunu genellikle lipit ve sonra karbonhidrat takip eder (Richmond ve Hu, 2013). Mikroalglerdeki toplam protein içeriği kuru biyokütlenin %30-70'inin oluşturur (Dolganyuk vd., 2020). Tablo 2.2'de çeşitli mikroalglerin protein içeriği, yaygın protein kaynaklarından önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin, *Arthrospira platensis* yaklaşık %65 oranında protein içerir ve bu oran yumurta (%47), süt (%26), et (%43), emek mayası (%39), soya unu (%37) gibi geleneksel gıdaların protein içeriğine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Türe bağlı olarak, mikroalg proteininin besin kalitesi de değişebilir. Bazı mikroalg proteinlerinin, geleneksel proteinlerle kalite açısından karşılaştırılabilir olduğu bulunmuştur (Richmond, 2004; Mosibo vd., 2024). Örneğin; *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Diatronema vlkianum* ve *Isochrysis galbana* türlerinin amino asit profilleri, yumurta ve soya fasulyesi gibi referans gıda ürünlerinin profillerine benzer olduğu bildirilmiştir (Batista vd., 2013).

Beslenme açısından bakıldığında, alg biyokütlesi önemli ve sürdürülebilir bir protein kaynağı olarak kabul edilir (Geada vd., 2021). *Spirulina platensis*, gıda endüstrisinde protein üretimi için kullanılan en yaygın mikroalgdir. Yüksek miktarda protein (%67,5), biyoaktif bileşikler (50 mg/100 g), çoklu doymamış yağ asitleri (%7), karbonhidratlar (%22) ve mineraller içerir. *Spirulina* dışında *Chlorella*, *Dunaliella salina* ve *Aphanizomenon flos-aquae* yaygın olarak kullanılan türlerdir. *Spirulina* ve *Chlorella* 20'den fazla ülkede tüketilmekte ve yüksek kaliteli amino asit profilleri nedeniyle oldukça talep görmektedir. *Spirulina* yaklaşık %51-71 oranında esansiyel (treonin, valin, metiyonin, lösin, fenilalanin, triptofan ve lizin) ve esansiyel olmayan amino asitler (glutamik asit, aspartik asit, arginin, alanin, prolin ve serin) içermektedir. Öte yandan, *Chlorella*'da tüm esansiyel amino asitlerle birlikte tirozin, sistin, aspartik asit, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin ve arginin gibi temel esansiyel amino asitler bulunmaktadır (Mosibo vd., 2024).

İnsan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin ve besin değerlerinin yanı sıra, proteinler gıdalarda istenen fiziksel özelliklerin oluşması için önemli bir rol oynamaktadır (Geada vd., 2021). Yapılan

çalışmalarda mikroalg proteinlerinin; çözünürlük, jel oluşturma, emülsifiye etme, film ve köpük oluşturma, su tutma ve yağ tutma gibi fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip oldukları bildirmiştir. Bu özellikler nedeniyle mikroalg proteinlerinin gıdalarda fonksiyonel bileşen olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Lordan vd., 2011; Mosibo vd., 2024).

Tablo 2.2. Mikroalglerin genel kimyasal bileşimi ve geleneksel gıdalarla karşılaştırılması (% KM)
(Richmond, 2004; Gouveia vd., 2008).

ALG	%Protein	%Lipit	%Karbonhidrat
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	2-7	25-30
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Synechococcus sp.</i>	63	11	15
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Isochrysis galbana</i>	27	17	17
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	6-14	32-57
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	22-38	25-33
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	62	3	23
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	43	21	17
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14
Ekmek mayası	39	1	38
Et	43	34	1
Süt	26	28	38
Yumurta	47	41	4
Pirinç	8	2	77
Soya	37	20	30

2.2.1. Fikobiliproteinler

Fikobiliproteinler çoğunlukla deniz yosunlarında bulunan çok önemli biyoaktif proteinlerdir. fonksiyonel durumlarında proteinlerin spesifik sistein kalıntılarına kovalent olarak bağlı olan doğrusal tetrapirel protez gruplarına (bilinler) sahip renkli protein gruplarıdır. Suda çözünen, parlak renkli ve yüksek floresanlı protein-pigment kompleksi olan fikobiliproteinler, genellikle kırmızı alglerde ve siyanobakterilerde, tilakoid zarların dış yüzeyinde diziler halinde düzenlenmiş fikobilizomlar olarak bulunur. Fikobiliproteinler: fikosiyanın (mavi), fikoeritrin (kırmızı) ve alofikosiyanın (mavi) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Fikobiliproteinler; sağlık, gıda ve kozmetik gibi çeşitli uygulama alanlarına sahip oldukları için ticari olarak büyük önem sahip doğal ürünlerdir. Sentetik gıda boyalarının toksik ve kanserojen olabileceği göz önüne alındığında, doğal gıda boyası olarak fikobiliproteinlerin kullanımı dünya çapında önem kazanmaktadır. Süt ürünleri, şekerlemeler, meşrubatlar, sakızlar vb. gıdalarda doğal renklendirici olarak kullanılmaktadır. Fikobiliprotein üretimi için en çok kullanılan deniz mikroalgleri, fikoeritrin için kırmızı alg *Phorphyridium* ve fikosiyanın için siyanobakteri *Spirulina*'dır (Manirafasha vd., 2016; Ijaola vd., 2024).

2.2.2. Mikroalg Proteinlerinin Biyoaktif Özellikleri

Mikroalglerde bulunan antioksidan, antihipertansif, antikanser, bağışıklık düzenleyici, karaciğeri koruyucu ve antikoagülan gibi birçok biyoaktif özellik, hem tüm proteinlerle hem de farklı enzimatik ve fermentasyon süreçleriyle elde edilebilen protein hidrolizatları veya peptitlerle ilişkilidir (Buono vd., 2014). Biyoaktif peptitler, sentetik moleküllere kıyasla hedef hücreler için daha yüksek biyoaktivite ve biyospesifite gösterdiği için gıda alanında özel ilgi kazanmışlardır (Bleakley ve Hayes, 2017). Yine de aktiviteleri esas olarak kimyasal yapılarına, uzunluklarına ve AA zincirinin hidrofobik/hidrofilik özelliklerine bağlıdır (Pimentel vd., 2019)

Mikroalgler düşük ışık yoğunlukları ve yüksek oksijen konsantrasyonları gibi ortamlarda gelişebildiği için olası oksidatif hasara karşı kendilerini koruyabilmektedirler (Fernando vd., 2024). Alglerden elde edilen antioksidan peptitler, antioksidan yeteneklerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gösterir; öncelikle serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görür, reaktif oksijen türlerini (ROS) engelleyerek lipitlere, proteinlere ve DNA'ya oluşabilecek oksidatif hasarı önler (López-García vd., 2022). *Chlorella* sp., *Navicula* sp. ve *Spirulina* sp., antioksidan peptitler için yaygın olarak çalışılan mikroalg türleri arasındadır. Bu türler, in vitro ve hücre bazlı analizlerde güçlü antioksidan kapasiteye sahip peptitler içerdiği belirtilmiştir (Fernando vd., 2024).

Antioksidan peptitlerde olduğu gibi, çoğu antihipertansif peptit de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsioidea*, *Spirulina platensis* ve *Nannochloropsis oculata* gibi birkaç mikroalg kaynağından türetilmektedir. Mikroalglerden türetilen antihipertansif peptitler kan hacmi, kan basıncı ve sıvı dengesi düzenlemesinde önemli bir rol oynar. Bu antihipertansif peptitler, antihipertansif özelliklerini değerlendirmek için in vitro ve bazı hayvan çalışmalarında kullanılmıştır. Mikroalglerden türetilen peptitlerin etki mekanizmaları Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) ve renin inhibisyonlarıyla ilişkilidir. Ek olarak, peptit kininlerini içeren karmaşık bir ağ olan kinin-nitrik oksit (NO) sistemi kan basıncı düzenlemesinde önemli bir rol oynar (Fitzgerald vd., 2011; Fernando vd., 2024).

Yapılan çalışmalarda mikroalg proteinlerinden elde edilen peptitlerin, kanser hücrelerinin büyümesini ve ilerlemesini engellediği bulunmuştur. *C. vulgaris*, *D. Salina*, *S. platensis* ve *P. lutheri* gibi çok sayıda mikroalg türünde kanser önleyici peptitler tanımlanmamıştır. *S. plantensis*'ten elde edilen polipeptitlerin meme ve karaciğer kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkiler göstermiştir. Ayrıca *Chlorella*, *Dunaliella* ve *Pavlova* cinslerinden suşlarından izole edilen peptitlerin karaciğer, mide, meme ve deri kanserlerinde antikanser özellikler göstermiştir (Zhang ve Zhang, 2013; Skjånes vd., 2021).

Araştırmalar, mikroalg proteinlerinin ve peptitlerinin antioksidan, antikanser ve antihipertansif gibi yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. *Tetraselmis suecica*'da tanımlanan antimikrobiyal peptitlerin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Guzmán vd., 2019). Safari vd., (2020), *Spirulina platensis*'ten izole ettikleri C-Fikosiyanin'inin

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus iniae* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı da antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

2.2.3. Mikroalg Proteinleri İçin Ekstraksiyon Yöntemleri

İşlenmemiş formlarında sindirilebilirlikleri düşük olduğundan, alg proteinlerinin biyoyararlanımlarını artırmak için yeni ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Ijaola vd., 2024). Bu yöntemler arasında ultrasonikasyon, ohmik ısıtma, darbeli elektrik alan ve mikrodalga gibi uygulamalar kullanılmaktadır. Ayrıca hücre içi bileşenlerin salınmasını sağlamak için duvarının parçalayan enzimler, çözücüler, ozmotik basınç gibi uygulamalar da protein ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile mikroalglerde %15,8 ile %73,5 arasında ve makroalglerde %25 ile %42 arasında değişen bir protein verimi sağlanabilir. Ekstraksiyon prosedürü, protein biyoaktivitesini, biyoyararlanımı, teknolojik işlevselliği ve tadı doğrudan etkileyeceğinden, istenen amaca göre seçilmelidir (Bleakley ve Hayes, 2017; Geada vd., 2021).

Ultrason destekli ekstraksiyon, belirli aralıklarla kavitasyon oluşturan ve daha sonra hücelere ve hücre duvarlarına bozulmasına neden olan ses dalgaları ile gerçekleşir. ultrasonla bağlantılı mekanik etkiler güçlü ve etkili spesifik olmayan hücre bozulmasına neden olur ve bunun sonucunda hücre içi bileşiklerin salınmasını sağlar (Geada vd., 2021; Ijaola vd., 2024).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ıslak biyokütlede bulunan suyun ve diğer polar moleküllerin titreşimini artırarak dielektrik ısınmaya neden olan elektromanyetik dalgaların (300 MHz ila 300 GHz arası frekans) kullanılmasıyla gerçekleşir (Geada vd., 2021). Mikrodalga destekli ekstraksiyonun mikroalglerle uygulanması ile hücre içinde sıcaklık ve basınç hızlı bir şekilde artmaktadır. Hücre içindeki basınç artışı, hücre bozulmasına yol açar ve çözücünün hücre matrisine nüfuz etmesine yardımcı olup hedef bileşiklerin çıkarılmasını kolaylaştırır (Geada vd., 2021; Ijaola vd., 2024).

Darbeli elektrik alan ve ohmik ısıtma, hücre bozulmasına neden olabilecek elektrik tabanlı yöntemlerdir. Elektrik akımı; ohmik ısıtma yönteminde düşük voltajlarda sürekli olarak, darbeli elektrik alan yönteminde de yüksek voltajlarda kesikli olarak yarı iletken bir malzeme aracılığıyla hücelere uygulanır. Ohmik ısıtma durumunda, uygulanan orta düzeydeki elektrik alanları nedeniyle, malzeme içerisinden geçen elektrik akımına karşı oluşan direnç, iç ısı dağılımına yol açar. Bu, elektrik alanların neden olduğu elektriksel bozulmalarla birleşerek sinerji içinde hareket eden hücrelerin/dokuların termal geçirgenleşmesine neden olur. Darbeli elektrik alan durumunda, hücre zarının geçirgenliği arttırmak için yüksek voltajlı elektrik (>1 kV/cm) alanlar uygulanarak hücre içi bileşenlerin salınması sağlanır (Geada vd., 2021).

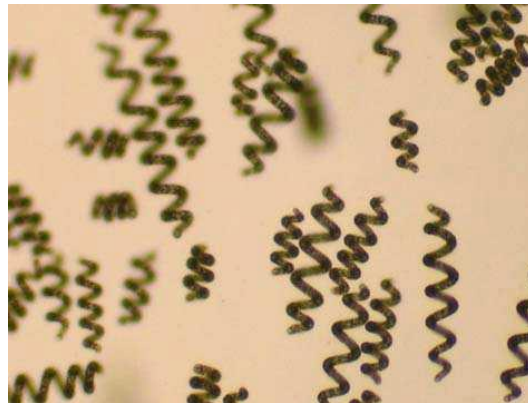
Enzimatik ekstraksiyon, alglerden protein çıkarmak için hücre duvarını parçalayan enzimlerin kullanıldığı yöntemdir (Ijaola vd., 2024). Makroalg hücre duvarları, alg proteinlerinin eldesi üzerinde olumsuz etkisi olan ve protein çıkarma verimliliğini azaltan çeşitli polisakkarit türlerinden oluşur (Bleakley ve Hayes, 2017). Bu nedenle; selüloz, ksilanaz, viskozim ve lizozim gibi enzimler hücre

duvarındaki polisakkarit moleküllerini parçalayarak daha yüksek protein elde edilmesini sağlar (Geada vd., 2021). Her mikroalgin hücre duvarı bileşimi farklı olduğu için enzimatik ekstraksiyon işlemi için pH, hidroliz süresi, sıcaklık ve enzim seçimi gibi parametrelerin incelenen mikroalg türüne göre optimize edilmesi gerekir (Ijaola vd., 2024).

Ozmotik şok, tanımlanmış kimyasal bir ortamda bulunan mikroalgin hücre zarındaki su miktarının hızlı bir şekilde değişmesine dayanır (Geada vd., 2021). Bu yöntemde, genellikle yüksek oranda konsantre bir madde varlığında hücreler su kaybederek parçalanır ve bu da ozmotik basıncın azalmasına neden olur. Böylece hücre içi bileşenlerin serbest kalması sağlanmış olur (Ijaola vd., 2024).

2.3. *Spirulina platensis*

Spirulina platensis, sağlıklı gıda endüstrisi ve su ürünleri yetiştiriciliğinde protein ve vitamin takviyesi olarak önemli ölçüde popülerlik kazanan fotosentetik, filamentli, spiral şekilli, çok hücreli ve mavi-yeşil bir mikroalgdir. Bu mikroorganizmalar, yüksek bitkiler gibi klorofil a içerdiği için botanikçiler tarafından *Cyanophyceae* sınıfına ait bir mikroalg olarak sınıflandırılmış; ancak bakteriyologlara göre prokaryotik yapısı nedeniyle bir bakteridir (Şekil 2.1). *S. platensis*; suda yetişir, kolayca hasat edilebilir ve işlenebilir. Ayrıca çok yüksek makro ve mikro besin içeriğine sahiptir (Tablo 2.3) (Habib vd., 2008; Kuru, 2012). Besinsel zenginliği, spirulan sülfatlı polisakkaritler, fenolik bileşikler, C-fikosiyanin, alofikosiyanin ve seleno bileşiklere atfedilen güçlü antioksidan özelliklerle tamamlanmaktadır. Diyet takviyesinde yaygın olarak kullanılan *S. platensis* özleri, diyabet ve kanser gibi durumların tedavisi ve önlenmesinin yanı sıra kan kolesterolünü ve ateroskleroza azaltmak için kullanılır (Gaur vd., 2024).



Şekil 2.1. Mikroalg *S. platensis*'in mikroskopik görünümü (Kuru, 2012).

S. platensis, gıda takviyesi, besin takviyesi, fonksiyonel gıda bileşeni, ambalajlamada aktif madde, hayvan yemi formüllerinde bileşen, biyoyakıt üretimi için ham madde, atık su arıtımı maddesi,

kozmetik ürünlerinde bileşen ve ilaçlarda bileşen olarak kullanılmaktadır (Khalid vd., 2024). *Spirulina*; et, yumurta, kurutulmuş süt, tahıllar ve soya fasulyesi gibi gıdalardan daha fazla protein içeriğine (kuru ağırlığın %50-70'i) sahip ve lösin, valin ve izolösin başta olmak üzere tüm temel amino asitleri içerir. Ancak *Spirulina* proteinleri; et, yumurta veya süt gibi standart gıda proteinlerine kıyasla metiyonin, sistein ve lizin açısından daha eksik olmasına karşın baklagillerden elde edilen proteinler de dahil olmak üzere tüm bitkisel proteinlerden daha üstündür (Hoseini vd., 2013). *Spirulina* kuru ağırlığının %50-70'ini oluşturan proteinler, fikobiliproteinler (fikosiyeninler, allofikosiyeninler ve fikoeritrin), depo proteinleri (özellikle C-fikosiyenin ve albümin), enzimler, ribozomal proteinler ve hücrel proteinler gibi çeşitli kategorileri oluşur (Barka vd., 2018; İlter vd., 2018). *Spirulina*'dan elde edilen proteinler; gıda, ilaç ve kozmetik dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde uygulamalar bulmaktadır. *Spirulina* ayrıca pigmentler, çoklu doymamış yağ asitleri, lipidler, vitaminler, polisakkaritler ve demir, manganez ve magnezyum gibi temel mineraller içerir. Yapılan çalışmalarda *Spirulina*'nın; antioksidan, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, anti-hipertansif ve antikoagülan gibi biyoaktif özellikte olduğunu göstermiştir. Ayrıca; kolesterol, kan basıncı düzenlemesi ve bağışıklık sistemi desteği üzerindeki etkileri de araştırmaktadır (Khalid vd., 2024). *S. platensis*'in genel bileşimi Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. *S. platensis*'in besin içeriği (Habib vd., 2008).

Bileşen	Değer (%)
Protein ve aminoasit	50-70
Karbonhidrat	14-19
Yağ (lipid)	4-7
Lif	3-7
Mineraller (kül)	3-11
Nem	4-9

Spirulina, uzun zamandır dünyanın dört bir yanındaki yerli halkların diyetlerinin önemli bir parçası olmuştur. Başlangıçta Afrika ve Orta Amerika'daki topluluklar tarafından protein kaynağı olarak tüketilen *Spirulina*, günümüzde önemli bir besin takviyesine dönüşmüş, hatta uzay görevlerindeki astronotlar için bile uygulama alanı bulmuştur (Gaur vd., 2024; Khalid vd., 2024). Meksika'da 16. yy'de yaşayan insanlar "tekuitlatl" adını verdikleri ve Texcoco gölünden hasat edildikten sonra güneşte kurutulmuş *Spirulina*'yı tüketmişlerdir. Benzer şekilde Afrika'da Çad gölü çevresinde yaşayan insanlar, "dihe" denilen güneşte kurutulmuş *Spirulina*'yı gıda olarak kullanmışlardır (Şekil 2.2) (Vonshak, 1997; Habib vd., 2008).



Şekil 2.2. *Spirulina*'dan elde edilen “dihé” (Koru, 2012).

Spirulina'nın, kendine özgü bileşimi, sürdürülebilir yetiştirme uygulamaları ve potansiyel sağlık katkıları nedeniyle dünya çapında değerini artırmıştır (Khalid vd., 2024). Bu nedenle; Birleşmiş Milletler gıda konferansında geleceğin en iyi yiyeceği olarak ilan edilmiştir (Soni vd., 2017). Dünya Sağlık Örgütü, *Spirulina*'yı insanlığın en iyi sağlık ürünü olarak tanımlamıştır. UNESCO'ya göre, *Spirulina* geleceğin en ideal yiyeceğidir. NASA ve Avrupa Uzay Ajansı'na göre, uzaydaki uzun vadeli uzay görevlerinde yetiştirilebilecek birincil yiyeceklerden biridir. FDA, onu "En iyi protein kaynaklarından biri" olarak doğrulamıştır (Soni vd., 2017).

Sıcak, alkali tatlı su ortamlarında iyi gelişir, ayrıca göletler veya tanklar gibi kontrollü ortamlarda da yetiştirilebilir. Yetiştirme süreci nispeten basittir ve geleneksel ürünlere kıyasla daha az kaynak gerektirir. *Spirulina* 'nın çeşitli çevre koşullarına uyum sağlayabilmesi, hızlı üreme oranıyla birleşince onu sürdürülebilir ve çevre dostu bir besin kaynağı olarak konumlandırmıştır (Khalid vd., 2024). *Spirulina*, Afrika'nın birçok ülkesinde, hala önemli bir protein kaynağı olarak insan gıdası olarak kullanılmaktadır ve doğal sudan toplanıp kurutulup yenmektedir. İnsan sağlığı ve gıda endüstrisinde önemli bir popülerlik kazanmıştır ve Asya'nın birçok ülkesinde protein takviyesi ve sağlık gıdası olarak kullanılmaktadır (Habib vd., 2008).

2.4. Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif peptitler, genellikle biyolojik aktiviteleri ve sağlık yararları olan yaklaşık 2-20 amino asitten oluşan kısa protein parçalarıdır. Ana protein içinde inaktif olmasına karşın, biyoaktif peptitler fermentasyon, gıda işleme veya gastrointestinal sindirim yoluyla salındığında hormonlar veya ilaçlara benzer çeşitli biyoaktiviteler gösterirler. Biyoaktif peptitlerin; antioksidan, antihipertansif, antimikrobiyal, antitrombotik, opioidler, immünomodülatörler olarak biyoaktif özellikleri bulunmaktadır. Biyoaktif peptitler; gıda proteinleri, soya, bakliyat tohumları, süt, peynir, fermente ürünler, sığır kolostromu, böcekler, omurgasızlar, mantarlar, bakteriler, deniz organizmaları ve mikroalgler gibi çok çeşitli doğal protein kaynaklarından elde edilebilir (Ejike vd., 2017; Ovando vd.,

2018; Ünal vd., 2018; Ijaola vd., 2024; López-García vd., 2022). Tablo 2.4'te, çeşitli gıda kaynaklarından elde edilen peptitlerin biyoaktif özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.4. Çeşitli gıdalardan elde edilen biyoaktif peptitler ve biyoaktiviteleri (Hartmann ve Meisel, 2007; López-García vd., 2022).

Biyoaktivite	Kaynak	İlgili proteinler
ACE inhibitörü/ Antihipertansif aktivite	Soya	Soya proteini
	Balık	Balık kas proteini
	Et	Et kas proteini
	Süt	α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin α -, β -, κ -Kazein
	Yumurta	Ovotransferrin Ovalbumin
	Tavuk derisi ve ayakaları	Kollajen
	Buğday	Buğday gliadini
	Brokoli	Bitki proteini
Antioksidant	Buğday	Buğday germ proteini
	Süt	α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin
	Soya	Glisin/konglisinin
	Pirinç endosperm	Pirinç ppeoteini
	Sardalya	Sardalya kası
	Somon balığı	Somon yan ürünleri
	Ton balığı	Ton balığı kemikleri
Antimikrobiyal	Yumurta	Ovotransferrin
	Süt	Lizozim α -, β -, κ -Kazein
	Sığır hemoglobini	Hemoglobini
	Pirinç kepeği	Pirinç kepeği proteinleri
	Bakla tohumları	Hidrolizat tohum proteinleri
	Domates posası	Hidrolizat proteinler
	Guava tohumları	Glisin
Mineral bağlama, antikarsinojenik	Süt	κ -Kazein (glikomakropeptit)
Hipokolesterolemik	Soya	Glisin/konglisinin
	Süt	β -Laktoglobulin
Antitrombotik	Süt	κ -Kazein (glikomakropeptit)
İmmünomodülatör	Prinç	Prinç albumini
	Yumurta	Ovalbumin
	Süt	α -, β -, κ -Kazein, α -Laktalbumin
	Buğday	Buğday gluteni
Sitomodülatör	Süt	α -, β -Kazein
Uyuşturucu etki	Buğday	Buğday gluteni
	Süt	α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin
		α -, β -Kazein
Uyuşturucuya karşı etki	Süt	Laktoferrin
		κ -Kazein

Biyoaktif peptitler sırasıyla: (a) protein kaynağının hazırlanması, (b) proteinin hidrolizi, (c) biyoaktif özelliklerin taranması, (d) biyoaktif peptitlerin izolasyonu ve saflaştırılması, (e) dizilim ve biyoaktif doğrulamanın belirlenmesi şeklinde adımlarla keşfedilebilir ve üretilebilirler (Ijaola vd.,

2024). Hidrolizden sonra elde edilen biyoaktif peptitler (hidrolizatlar); membran filtrasyonu, elektroforez, boyut dışlama kromatografisi, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), iyon değişim kromatografisi, hızlı protein sıvı kromatografisi (FP-LC) ve afinite kromatografisi gibi çok çeşitli ayırma teknikleri kullanılarak izole edilebilir ve saflaştırılabilir (Acquah vd., 2020). Ayrıca, sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometrisi (LC-MS) ve kütle-kütle spektrofotometrisi (MS-MS) gibi spektrofotometrik yöntemler, biyoaktif peptitlerin moleküler yapılarını ve molekül ağırlıklarını belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Samarakoon ve Jeon, 2012).

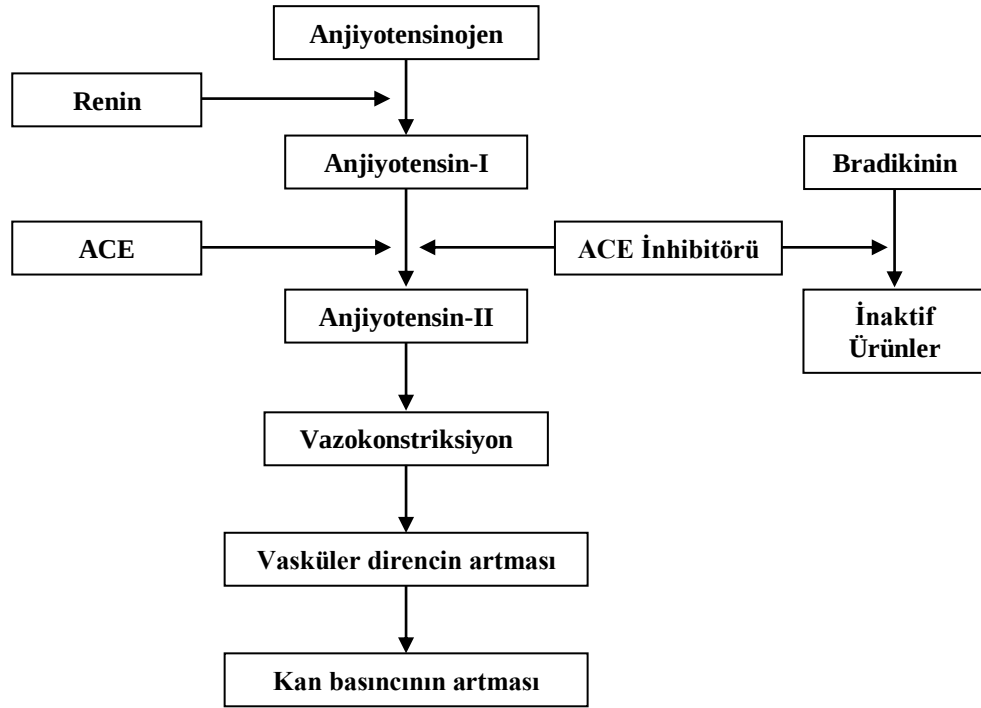
Mikroalg proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitler, herhangi bir mutajenite, toksisite veya alerjenite olmaksızın hedef hücrelere yönelik daha iyi biyoaktivite gösterdikleri için diğer sentetik moleküllerden daha güvenli kabul edilir. Mikroalglerden elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidatif, anti-hipertansif, antimikrobiyal, antitrombotik, opioid, hipokolesterolemik, iştah baskılayıcı, mineral bağlayıcı, immünomodülatör ve sitomodülatör özellikler dahil olmak üzere birçok yararlı etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Ijaola vd., 2024). Tablo 2.5'te mikroalglerden elde edilen biyoaktif peptitlerin amino asit dizilimi ve biyoaktif özellikleri verilmiştir.

2.4.1. Biyoaktif Peptitlerin Antihipertansif Özellikleri

Kardiyovasküler hastalık günümüzde dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve hipertansiyon kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Kan basıncının düzenlenmesi esas olarak renin anjiyotensin yoluyla sağlanır. Kısaca, renin anjiyotensin sistemi böbreklerden kan sistemine renin salgılanmasıyla çalışır. Renin daha sonra peptit anjiyotensinojene bağlanır ve anjiyotensin-I oluşturur. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) anjiyotensin I'e bağlanır ve onu parçalar ve onu oldukça güçlü vazokonstriktör anjiyotensin II'ye dönüştürür, böylece kan basıncını artırır (O'Connor vd., 2022).

Anormal derecede yüksek kan basıncı, kardiyovasküler rahatsızlık için başlıca risk faktörlerinden biridir. Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE), renin-anjiyotensin sistemi (RAS) ve elektrolit homeostazı adı verilen kan basıncını düzenleyen yoldan sorumlu olan ana enzimlerden biridir. Renin-anjiyotensin sistemi ve kinin-arginin-nitrik oksit sistemi yolları kan basıncını kontrol etmek için önemlidir (Fernando vd., 2024). Böbreğin dolaşımı tarafından salgılanan renin enzimi, karaciğerden salgılanan inaktif peptit anjiyotensinojeni parçalayarak peptit anjiyotensin-I ile sonuçlanır. Daha sonra, ACE anjiyotensin-I üzerinde etki ederek anjiyotensin-II üretir ve vazodilatör bradikininin inaktive ederek kan basıncında artışa neden olur. Bu nedenle, kan basıncı renin veya ACE'yi inhibe ederek kontrol edilebilir. Bu nedenle, renin ve ACE inhibitör faktörleri hipertansiyon tedavisinde birincil hedefler haline gelmiştir. Kaptopril gibi sentetik ACE inhibitörleri antihipertansif ilaçlar olarak kullanılmıştır. İlginç bir şekilde, bazı hastalıklar, genetik veya çevresel faktörler RAS'ı uyandırabilir ve insan vücudundaki ACE seviyelerini yukarı düzenleyebilir ve yüksek anjiyotensin-II

seviyeleri kan damarı daralmasına ve hipertansiyona yol açar (Alper ve Calhoun, 1999; Unger, 2002). Biyoaktif peptitlerin renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde (RAAS) ACE'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Renin Anjiyotensin Sistemi (Wilson vd., 2011).

ACE inhibitör aktivitesini ve in vitro inhibisyonu belirlemek için en yaygın kullanılan yöntemler, ACE aktivitesi için substratlar olarak hippuril-L-histidil-lösün (HHL) ve furanakriyol-L-fenilalanil-glikilglisin (FAPGG) kullanır. ACE inhibisyonu genellikle sentetik tripeptitler ve salınan N-terminal amino asidin miktarının belirlenmesiyle ölçülür. Çoğu yöntem, substrat olarak hippuril-L-histidil-L-lösünün (HHL) kullanıldığında ACE tarafından katalize edilerek dipeptitin olan hippurik asitin (HA) salınmasına neden olur. Daha sonra açığa çıkan HA'nın miktarı 228 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür ve ACE aktivitesi belirlenir (Murray ve FitzGerald, 2007; Hayes, 2013).

ACE, ilaçlarla kontrol altında tutulabilir ve yaygın olarak ilaçlarda kaptopril gibi ACE inhibitörleri içerir [68]. Bu inhibitörler, anjiyotensin-I'in anjiyotensin-II'ye ACE aracılı dönüşümünü önleyerek kan basıncında bir artışı önleyerek işlev görür. Bununla birlikte, kaptopril, enalapril ve lisinopril gibi ilaçların kuru öksürük, cilt döküntüleri, böbrek yetmezliği ve konjenital malformasyonlar gibi yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, doğal kaynaklardan ACE inhibitör aktivitesine sahip yeni peptitlerin izole edilmesine yönelik artan bir ilgi bulunmaktadır. (O'Connor vd., 2022). *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsioidea*, *Spirulina platensis* ve *Nannochloropsis oculata* gibi mikroalglerden birçok antihipertansif peptit ekstrakte edilmiştir (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Mikroalglerden elde edilen biyoaktif peptitlerin amino asit dizilimi ve biyoaktiviteleri (Samarakoon ve Jeon, 2012; Ovando vd., 2018; Fernando vd., 2024).

Biyoaktivite	Mikroalg türleri	Biyoaktif peptitin amino asit dizilimi
ACE inhibitörü/ Antihipertansif aktivite	<i>Chlorella vulgaris</i>	Val-Glu-Cys-Iyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Glu-Phe Ile-Val-Val-Glu
	<i>Spirulina platensis</i>	Ile-Ala-Glu Phe-Ala-Leu Ala-Glu-Leu Ile-Ala-Pro-Gly Val-Ala-Phe Ile-Gln-Pro Val-Glu-Pro
	<i>Porphyra yezoensis</i>	Ile-Tyr Met-Lys-Tyr Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr Leu-Arg-Tyr
Antioksidan	<i>Chlorella vulgaris</i>	Val-Glu-Cys-Iyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Glu-Phe
	<i>Chlorella ellipsiodes</i>	Leu-Asn-Gly-Asp-Val-Trp
	<i>Spirulina platensis</i>	Thr-Asp-Pro-Ile(Leu)-Ala-Ala-Cys-Ile(Leu)
	<i>Navicula incerta</i>	Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu
Antikanser	<i>Chlorella vulgaris</i>	Val-Glu-Cys-Iyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Glu-Phe
	<i>Spirulina platensis</i>	Nanopoliipeptit Y2-C
Antienflamatuar	<i>Spirulina maxima</i>	Leu-Asp-Ala-Val-Asn-Arg

2.4.2. Biyoaktif Peptitlerin Antioksidan Özellikleri

Antioksidan peptitler 5-16 amino asit kalıntısı içerir. Gıdalardan üretilen peptitlerin avantajları güvenli olmaları, düşük maliyetli olmaları, emilimlerinin kolay olması ve nispeten yüksek bir stabiliteye sahip olmalarıdır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek seviyeleri nedeniyle oluşan oksidatif hasar, belirli kanserler, diabetes mellitus, hipertansiyon ve nörodejeneratif ve inflammatuar hastalıklar ile yaşlanma gibi birçok kronik rahatsızlıkta rol oynamaktadır. Bu nedenle, biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitelerinin oksidatif homeostaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Fernando vd, 2024).

Proteinlerin oksidasyonu amino asit R-gruplarında değişikliklere ve proteinlerin polimerizasyonuna ve/veya parçalanmasına neden olabilir. Örneğin, oksijen yokluğunda hidroksil radikalleriyle sığır serum albümininin oksidasyonu, oksijen varlığında kapsamlı protein çapraz bağlanmasına neden olmuştur ve protein boyutunda bazı değişiklikler gözlemlenmiştir. Alfa-hidrojen atomlarının omurga karbonlarına soyutlanması, peptit veya amid bağlarının kırılmasına neden olur. Serbest radikal saldırısıyla belirli bir amino asit kalıntısına verilen oksidatif hasar büyük ölçüde R-grubu tarafından belirlenir. Bununla birlikte, çözücü erişilebilirliği ve bitişik kalıntıların kimyasal özellikleri de oksidasyonu etkileyebilir (Fernando vd, 2024). Tüm 20 yaygın amino asit potansiyel olarak oksitlenebilir olsa da, oksidasyona karşı en savunmasız amino asitler, nükleofilik kükürt içeren yan zincirler, yani sistein ve metionin veya hidrojenin kolayca soyutlandığı aromatik yan zincirler,

yani triptofan, tirozin ve fenilalanin içerenlerdir. Ek olarak, histidinin imidazol içeren yan zinciri de oksidatif olarak kararsızdır. Peptitlerle sonuçlanan proteinlerin parçalanması, amino asit R gruplarının ekspresyonunu iyileştirir, bu nedenle peptitlerin antioksidan özellikleri proteinlerden nispeten daha yüksektir. Genel olarak, proteinlerin ve peptitlerin antioksidan fonksiyonunun modu, ROS'leri inaktive etme, serbest radikalleri temizleme, hidroperoksitleri azaltma, prooksidatif geçiş metallerini şelatlama ve belirli oksidanları enzimatik olarak ortadan kaldırma gibi karmaşık reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Elias vd., 2008).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) sürekli üretimi ve oksidatif savunma sisteminin aktivasyonu ile birlikte kardiyovasküler hastalıkların önemli bir nedenidir. ROS, hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$), süperoksit radikalleri ($\text{O}_2\cdot^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijen (O_2), hipoklorit (ClO^-) ve nitrik oksit radikalleri (NO) dahil olmak üzere oksijenli serbest radikallerdir (Cai vd., 2022). Normal şartlar altında, bu maddeler vücuttan hızla uzaklaştırılır. Bununla birlikte, vücut çok fazla üretirse veya hızla uzaklaştırılamazsa, patolojik hasar, biyolojik makromolekül hasarı ve insan doku hücrelerinin işlev bozukluğu meydana gelebilir ve bu da sonunda kardiyovasküler hastalık, nefropati, nörolojik hastalık, kanser vb. dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açar. Bu nedenle, antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek veya serbest radikallerin oluşumunu veya çürümelerini önlemek için hayati öneme sahiptir. Antioksidan peptitler, kardiyovasküler hastalık riskini iyileştirme potansiyeline sahiptir. Antioksidan peptitler ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki kapsamlı araştırmalarla doğrulanmış olup son yıllarda giderek daha fazla ilgi görmektedir (Du vd., 2024).

Deniz mikroalg türlerinin yüksek çeşitliliğe sahip olduğu ve düşük ışık yoğunlukları ve yüksek oksijen konsantrasyonları gibi aşırı ortamlarda gelişme yeteneği olduğu bildirilmiştir, bu da onları oksidatif hasara karşı daha öz-koruyucu hale getirir (Guedes vd., 2011). Ancak, *Chlorella sp.*, *Navicula sp.* ve *Spirulina sp.* antioksidan biyo-peptitler için yaygın olarak çalışılan mikroalg türleri arasındadır (Tablo 2.5). Antioksidan peptitler, çeşitli hücre dışı bakteriyel proteazlar kullanılarak *Chlorella protothecoides*'in hidrolizi ile üretilmiştir. Elde edilen hidrolizatlar, DPPH radikal süpürücü, hidrojen peroksit ve hidroksil serbest radikalının önemli ölçüde azaltılması şeklinde yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (Olena vd., 2022). Ayrıca, *Chlorella pyrenoidosa*'dan elde edilen bir peptit karışımı cilt fibroblastlarında antioksidan özellikler göstermiştir. Enzimatik hidroliz, mikroalglerden antioksidan peptit üretiminin en yaygın kullanılan yöntemidir (Shih ve Cherng, 2012).

2.4.3. Biyoaktif Peptitlerin Antikanser/Antitümör Özellikleri

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve sağlıklı yaşam tarzı seçimleri, kötü beslenme ve artan çevre kirliliği gibi çeşitli faktörler nedeniyle görülme sıklığı artmaya devam etmektedir. Kanser, uygunsuz hücre fonksiyonu ve anormal hücre büyümesi ile karakterize edilebilir. Kanser için; immünoterapi, hedefli tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi geleneksel tedavi yöntemleridir. Ancak, bu yöntemler olumsuz yan etkiler ve tümör tekrarlama potansiyeli ile

sınırlıdır. Bu yaklaşımların sınırlamaları olduğundan ve ciddi yan etkilere yol açabileceğinden, kanser tedavisi ve/veya önlenmesi için daha fazla terapötik seçeneği araştırmak çok önemlidir. Buna karşılık, biyoaktif peptitler kanser hücrelerinin büyümesini kontrol etmek için kullanılabilir (O'Connor vd., 2022; Begum vd., 2024; Kit ve Chang, 2024).

Literatürde bildirildiği üzere, makroalglerden elde edilen peptitlerin güçlü anti-tümör ve antikanser gösterdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. (Sheih vd., 2010) *C. vulgaris* atık proteininden türetilen VECYGPNRPF peptidinin, hücre büyümesini inhibe ederek ve hücre ölümünü indükleyerek insan mide kanseri hücresi için anti-proliferasyon etkisi olduğunu bulmuşlardır. Wang ve Zhang (2016) yaptıkları çalışmada; tripsin, alkalaz ve papain enzimleri tarafından *Spirulina (Arthrospira) platensis* proteininin tek ve ardışık hidrolizi kullanılmıştır. Çalışmada enzimatik hidrolizatların çoğu (tripsin hidrolizatı hariç), kemoterapi ilacı olarak kullanılan 5-fluorourasil (5-FU) ile karşılaştırıldığında meme kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri ve karaciğer kanseri hücrelerine karşı daha yüksek anti-kanser aktivitesi göstermiştir. Ayrıca çalışmada, papain hidrolizatından bir peptit (YGFVMPSGLWFR) saflaştırılmış ve akciğer kanseri hücreleri üzerinde en yüksek anti-tümör aktivitesini göstermiştir. Benzer bir çalışmada; *Porphyra haitanesis* proteinlerinin tripsin hidroliziyle elde edilen peptitlerin antikanser etkileri olduğu belirtilmiştir. Çalışmada VPGTPKNLDSRP peptidi, karaciğer kanseri hücreleri üzerinde 5-FU'dan daha güçlü ve en yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip peptit olduğu bildirilmiştir (Fan vd., 2017).

2.4.4. Biyoaktif Peptitlerin Antidiyabet Özellikleri

Diyabet; böbreklere, gözlere, kan damarlarına ve kalbe zarar veren kandaki yüksek glikoz seviyelerinin neden olduğu kronik bir metabolik bozukluktur. Diyabet, tip 1 ve tip 2 olarak ikiye ayrılır. Diyabet vakalarının toplam %90-95'i oluşturan tip 2 diyabet, insülin direnci ve insülin salgılanmasından kaynaklanır. Tip 2 diyabetin tedavisi için kan şekeri seviyelerini düşürmek ve insülin direncini azaltmak için dipeptidil peptidaz-4 (DPP-IV), α -glukozidaz ve α -amilaz enzim inhibitörleri içeren ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak, mevcut tedaviler sıklıkla istenmeyen yan etkilere neden olduğu için olumsuz etkileri olmayan antidiyabetik ilaçların geliştirilmesine ve farmakolojik kullanım için doğal ürünlerin kullanımına olan ilgi artmaktadır. Yapılan çalışmalarda, protein hidrolizatları ve peptitleri diyabetin tedavisinde etkili olabileceğini göstermiştir. Son araştırmalar, *A. platensis*, *Chlorella* sp., *P. palmata*, *Caulerpa* spp., *Porphyra dioca*, *Ulva* spp. gibi mikroalg türlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktivitesini ortaya koymuştur (Begum vd., 2024; Kit ve Chang, 2024).

Chlamydomonas, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Monoraphidium*, *Parachlorella* ve *Scenedesmus* gibi çeşitli mikroalg türlerinin amino asit fraksiyonları, α -glukozidaz ve α -amilaza karşı sırasıyla 242-3131 $\mu\text{g/mL}$ ve 230-298 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeriyle inhibe edici aktivite göstermiştir (Siahbalaie vd., 2021). Hu vd. (2019), *A. platensis*'ten anti-diyabetik aktiviteler gösteren LRSELAAWSR,

RNPFVFAPTLTVAAR ve GVPMPNK peptitlerini tanımladılar. (Prabakaran vd. (2020), *S. platensis*'ten elde ettikleri fikosiyaninin, β -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon analizleri ile anti-diyabetik aktivitesini değerlendirdiler. Çalışmada 250 μ g/mL konsantrasyonunda fikosiyanin uygulaması, β -glukozidaz ve α -amilaz aktivitesini sırasıyla %65 ve %72 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *P. palmata* hidrolizatlarında tanımlanan peptitlerin DPP-IV inhibitör aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, tanımlanan üç peptit; ILAP, LLAP ve MAGVDHI dizilimine sahip olup DPP-IV inhibisyon değerleri sırasıyla %93,8, %92,4 ve %89,8 olarak bulunmuştur (Harnedy vd., 2015).

2.4.5. Biyoaktif Peptitlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Gıda ürünlerinin, lipid oksidasyonu ve mikrobiyal bozulmadan kaynaklı stabilitesinde ve raf ömründe önemli bir azalma meydana gelmektedir. Gıda ürünlerinin bozulmasını önlemek için doğal koruyucu maddeler ve antibakteriyel bileşiklerin üretilmesi oldukça önemlidir. Antimikrobiyal peptitler, çeşitli mikroorganizma enfeksiyonlarına (parazitler, protozoa, virüsler, bakteriler ve mantarlar) karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bileşiklerin doğal kaynaklarıdır (Begum vd., 2024). Antimikrobiyal peptitler esas olarak, bakteri yüzeylerinde bulunan anyonik bileşenlerle etkileşime olarak tanıyan katyonlardan oluşur. Bu etkileşim, bakteri hücre zarında hasara ve nihayetinde patojenik mikroorganizmaların ölümüne yol açar. Öte yandan, AMP'ler antibakteriyel etkilerini göstermek için DNA ve RNA'yı da hedef alır (Mao vd., 2024). Peptitlerin antimikrobiyal aktivitesi, peptidin elde edilme yöntemine, kaynağına, izolasyonuna ve saflaştırma tekniklerine bağlı olarak değişir. Antimikrobiyal peptitler yapılarına göre üç kategoriye ayrılabilir: (1) helezonik doğrusal peptitler, (2) açık uçlu siklik peptitler ve (3) birincil yapılarında yüksek miktarda prolin/histidin ve glisin bulunan disülfür köprülü siklik peptitler. Bakteriyel çoğalma, pozitif yüklü peptitler ve hidrofobik amino asitler tarafından hücre zarına nüfuz etme ve reaksiyona girme yoluyla inhibe edilebilir (Begum vd., 2024). Yapılan bir çalışmada, *S. platensis*'in papain ve alkali proteaz ile enzimatik hidrolizi sonrası 18 amino asitten oluşan antimikrobiyal peptit tanımlanmıştır. KLVDASHRLATGDVAVRA dizine sahip olan antimikrobiyal peptit, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı inhibe edici aktivite göstermiştir (Sun vd., 2016).

2.5. Biyoaktif Peptitlerin Üretilmesi ve Saflaştırma Yöntemleri

Biyoaktif peptitler protein açısından zengin çoğu gıda ürününde bulunabilir ve daha yüksek protein içeriğine sahip gıdaların tüketilmesi ile elde edilirler (López-García vd., 2022). Biyoaktif peptit tanımlamasında; kaynak seçimi, protein ekstraksiyonu, enzim ve hidroliz koşullarının seçimi, potansiyel biyoaktivite taraması, fraksiyonlama, saflaştırma, dizi ve yapısal tanımlama gibi çeşitli adımlar yer alır (Begum vd., 2024).

2.5.1. Enzimatik Hidroliz

Proteinlerin enzimatik hidrolizi, biyoaktif peptitleri üretmenin en yaygın yoludur. Protein kaynağı seçildikten sonra, hidroliz, ilgi duyulan peptitlerin salınımı için bir veya daha fazla spesifik proteaz kullanılarak gerçekleştirilir. Peptitlerin salınımını etkileyen faktörler, hidrolizin süresi, protein hidrolizinin derecesi, enzim-substrat oranı ve hidrolizden önce proteinlerin işlenmesidir. Çok sayıda bilinen biyoaktif peptit, sindirim enzimatik bir işlem ve pepsin, tripsin, alkalaz, kimotripsin, pankreatin ve termolizin gibi proteinazların farklı kombinasyonları kullanılarak üretilmiştir (López-García vd., 2022).

In vitro hidroliz için, esas olarak mikrobiyal, hayvansal veya bitkisel kaynaklardan elde edilen ticari olarak temin edilebilen enzimler kullanılırken, *in vivo* proteoliz gastrointestinal enzimleri kullanır. Bromelain ve pepsin gibi bitki kaynaklı enzimler, hayvansal kaynaklı enzimler (tripsin, pepsin), bakteriyel enzimler (nötraz ve alkalaz) ve fungal enzimler (fungal proteaz), *S. platensis*'ten peptit üretimi için yaygın olarak kullanılır. Genellikle, daha yüksek bir verimin üretimi için endo- ve ekzo-proteazların bir kombinasyonu kullanılır. Endo-proteaz, nonterminal amino asidin (molekül içinde) peptit bağını koparıırken, ekzo-proteaz, terminal amino asitlerin uç parçasından peptit bağını koparır. Genellikle, sindirim enzimleri proteinlerin peptitlere kısmi parçalanmasını sağlamak ve biyo-erişilebilirliği iyileştirmek için faydalıdır. Çeşitli enzimler farklı kesme özelliklerine sahiptir ve tek veya çoklu işlevsel aktivitelerden sorumlu olan farklı yapısal özelliklere sahip peptit dizileri üretir (Begum vd., 2024). Pepsin, tripsin ve kimotripsin; antihipertansif, antibakteriyel, immünomodülatör ve opioid peptitlerin açığa çıkmasını sağlayan önemli enzimlerdir. Alkalaz, termolisin ve sübtilis, ACE inhibitörleri, antibakteriyel ajanlar, antioksidanlar, immünomodülatörler ve opioidler gibi çeşitli biyoaktif peptitlerin salınmasında kullanılan diğer proteolitik enzimlere örnektir (López-García vd., 2022).

Enzimatik hidrolizin avantajları tam proses kontrolüne izin verdiği için daha kolay tekrarlanabilir olması, ölçeklendirilmesinin kolay olması ve genellikle mikrobiyal fermantasyondan daha kısa bir reaksiyon süresine sahip olmasıdır (López-García vd., 2022). Enzim türü, konsantrasyon, pH, protein kaynağı gibi hidroliz koşulları ve sıcaklık ve zaman gibi ekstraksiyon koşulları, elde edilen hidrolizatı büyük ölçüde etkiler. Bu koşulların optimize edilmesiyle daha yüksek peptit konsantrasyonuna sahip hidrolizat elde edilebilir (Begum vd., 2024). Proteazlar ayrıca, kimyasal hidrolizde olduğu gibi sağlığa zarar verebilecek moleküller oluşturmeyen ve yüksek verimlilik oranına sahip iyi tanımlanmış peptit profillerinin oluşturulmasında avantajlara sahiptir ve bu da onları fonksiyonel gıdaların veya nutrasötiklerin formülasyonunda uygulamalar için uygun hale getirir (Aluko, 2012).

2.5.2. Mikrobiyal Fermantasyon

Optimum koşullar altında, mikrobiyal büyüme ve metabolizma yoluyla üretilen hücre dışı proteaz, ihtiyaç duyulduğunda proteinleri biyoaktif peptitlere hidrolize etmek için kullanılabilir. Geleneksel olarak, mikrobiyal fermantasyon öncelikle soya fasulyesi gibi tarımsal ürünlerin üretiminde kullanılmıştır. Ancak, son çalışmalar mikrobiyal fermantasyonun su ürünlerinden biyoaktif peptitleri çıkarma potansiyelini ortaya koymuştur. Mikroorganizmaların karmaşık enzim sistemi nedeniyle, endojen enzimler proteinleri daha küçük peptitlere parçalar ve modifiye edilmiş enzimler açığa çıkan hidrofobik bağların acı özelliklerini değiştirerek nispeten yumuşak bir tada sahip yeni üretilen daha küçük peptitlerin yaratılmasına neden olur. Bu avantaj, su ürünlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin hazırlanması için mikrobiyal fermantasyonun enzimatik hidrolize göre üstünlüğünü vurgular (Mao vd., 2024).

Protein hidrolizi esas olarak mikroorganizmaların aktivitesi ve fermantasyon sırasında salgıladıkları peptidazlar nedeniyle gerçekleşir. Laktik asit bakterileri, yüksek proteolitik aktiviteleri nedeniyle bu amaç için kullanılmıştır. Starter ve starter olmayan kültürler olarak kullanılan bazı laktik asit bakterileri; *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* suşlarına aittir (López-García vd., 2022). Üretilen peptitlerin türü, miktarı ve aktivitesi kullanılan özel kültürlerle bağlıdır. Yoğurt fermantasyonunda kullanılan laktik asit bakterilerinin reaktif oksijen türlerini stabilize edebilen ve lipoperoksidasyonu inhibe edebilen peptitler ürettiği bildirilmiştir (Lin ve Yen, 1999). Wang vd., (2008), *Acetes chinensis*'i fermente etmek için *Lactobacillus fermentum* SM 605'i kullandı ve fermente karides ezmesinden üç ACE inhibitör peptidi (DP, GTG ve ST) izole ettiler. Ayrıca, yapılan başka çalışmalarda *Bacillus* bakterilerinin su ürünlerinin fermantasyonundaki önemini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* A26 ve *Bacillus amyloliquefaciens* An6, *Sardinella aurita*'yı fermente etmek için kullanıldı ve izole edilen NVPVYEGY peptidi ACE inhibitör ve antioksidan özellikler gösterirken, ITALAPSTM peptidi ACE inhibitör özellik göstermiştir (Jemil vd., 2016). Gao vd., (2021), *Bacillus natto*'yu fermente edici bir madde olarak kullanarak *Chlamys farreri*'nin fermente ürünlerinden beş yeni ACE inhibitör peptidini (AGFAGDDAPR, CDVDIR, IIAPPER, IWHHTFYNELR ve EIQTAVR) başarıyla izole edip saflaştırdılar.

2.5.3. Kimyasal Sentez

Kimyasal sentez esas olarak katı faz sentezini ve sıvı faz sentezini içerir. Katı faz sentezi, amino asidin C-terminalinin reçine üzerinde immobilize edilmesini, ardından amino asitleri bağlamak için sıralı birleştirme ve koruma kaldırma işlemlerini içerir. Daha sonra hedef peptit, peptit zinciri uzatıldıktan sonra reçineden ayrılır. Katı faz sentezi, peptit sentez verimliliğini önemli ölçüde artırır ve çeşitli uzunluklarda su ürünlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin üretiminde yaygın olarak

kullanılır (Mao vd., 2024). (Liu vd., 2022), katı faz sentezini kullanarak *Mytilus coruscus*'tan KKQHISGFNIDQFCPHAQK ve KGVCEKNRNIECWGY dahil olmak üzere farklı dizi uzunluklarına sahip antimikrobiyal peptit elde etmişler.

Sıvı faz sentezi, amino asitleri sıvı fazda yoğunlaştırmayı ve bağlamayı içeren peptit sentezi için kullanılan başka bir yöntemdir. Hedef peptit daha sonra saflaştırma yoluyla elde edilir. Bu teknik, düşük molekül ağırlıklı ve alışılmadık yapılara sahip hedef peptitlerin sentezlenmesi için daha avantajlıdır. Ancak, tekrarlanan yoğunlaştırma, ayırma ve saflaştırma adımları nedeniyle sıvı faz sentezinin zaman alıcı ve emek yoğun olduğunu belirtmek önemlidir. Bu nedenle, uygulanabilirliği büyük ölçüde sınırlıdır ve peptitlerin kimyasal sentezi için baskın yaklaşım olarak katı faz sentez yöntemi ile değiştirilmiştir (Mao vd., 2024).

2.5.4. Membran Filtrasyonu İşlemi

Membran filtrasyonu, örneğin farklı basınçlarda geçirgenliği ve tutulması için bir membran sistemi kullanılır. Gıda kaynaklarında, bu yöntem biyoaktif peptitlerin saflaştırılması için yaygın olarak kullanılır (Sridhar vd., 2021). Bu işlem esas olarak membranın gözenek boyutuna göre dört türe (ultrafiltrasyon, ters ozmoz, mikrofiltrasyon ve nanofiltrasyon) ayrılır. Bu yöntemler arasında ultrafiltrasyon, moleküler ağırlık kesme değerine göre peptit saflaştırma için en ekonomik, çevre dostu ve hızlı yöntemdir. Ultrafiltrasyon, 1, 3, 5 ve 10 kDa dahil olmak üzere çeşitli moleküler ağırlık kesme membranlarıyla gerçekleştirilir (Liu vd., 2022; Begum vd., 2024).

Membran filtrasyonu işlemi; hidrofobik peptitler ve yarı geçirgen membranın etkileşimi, saf peptit elde etmenin zorluğu, büyük boyutlu moleküllerin filtrasyonu, membranların tıkanması, membranların kirlenmesi ve büyük örnek hacimlerinin ayrılması gibi bazı sorunları beraberinde getirir. Bu sorunları çözmek için, membran filtrasyon teknolojisi, çok adımlı geri dönüşüm membran reaktörü, elektrodializ ve kromatografik teknikler gibi diğer bazı tekniklerle birlikte kullanılarak sağlık açısından daha iyi faydalar sağlayan biyoaktif peptitlerin elde edilebilir (Sridhar vd., 2021).

2.5.5. Kromatografik Yöntemler

Peptitlerin saflaştırma işlemi; peptitlerin çözünürlük, polarite, yük, moleküler ağırlık ve belirli kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerine dayalı bir dizi adımı içerir. Kromatografik yöntemler, peptitlerin saflaştırma en çok kullanılan yöntemlerden biridir (Begum vd., 2024). Kromatografi, sabit ve hareketli fazlarla tutulmaları ve etkileşimlerine dayalı olarak bileşiklerin bir karışımdan saflaştırılmasında ve ayrılmasında hayati bir rol oynar. Belirli bileşenlerin moleküler özelliklerine göre, iyon değişimi, sıvı-katı adsorpsiyonu, sıvı-sıvı ayırımı ve boyut dışlama olmak üzere dört ayırma tekniğine ayrılırlar. Kromatografik yöntemler genellikle protein kaynaklarından çeşitli bileşiklerin tanımlanması için MS (kütle spektrometrisi dedektörleri),

UV, floresans ve diyot-array gibi diğer dedektörlerle birlikte kullanılır. Peptit seçimi için pH'ı 2-8 ve UV aralığı <220 nm olan silika bazlı malzemeden oluşan bir kolon kullanılır (Coskun, 2016).

Biyoaktif peptitlerin saflaştırılması için HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yaygın olarak kullanılan bir sistemdir. RP-HPLC (ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi) sistemi, bileşikleri protein hidrolizat karışımından belirli kolon aracılığıyla ayırır. Normal HPLC, hidrofilik peptitlerin tespiti için yaygın olarak kullanılır. CIEF (kılcal izo-elektrik odaklama), CE (kapiler elektroforez) ve IEC (iyon değişim kromatografisi), biyoaktif peptitleri ayırmak için negatif veya pozitif yüklere olan eğilimleri belirlemek için kullanılır. GFC (jel filtrasyon kromatografisi), sulu çözeltiyi moleküler ağırlığa göre ayırmak için kullanılır. Ayrıca, FPLC (hızlı protein sıvı kromatografisi) ve GPC (jel geçirgenlik kromatografisi) de saflaştırma için kullanılan kromatografik sistemlerdir (Begum vd., 2024).

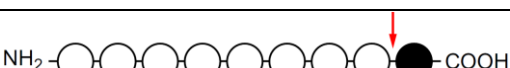
Peptit yapısının tanımlanması ve çeşitli analizlerle spesifik aktivitenin ölçülmesi için saflaştırma en önemli adımdır. Peptit saflaştırması için yaygın olarak kullanılan analitik adımlar, membran filtrasyon sistemleri ve UHPLC (ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi), SEC (boyut dışlama kromatografisi), RP-HPLC (ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi), HILIC (hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi) ve CE (kapiler elektroforez) gibi kromatografi teknikleridir (Abuine vd., 2019). Peptit dizisi tanımlaması için hızlı atom bombardımanı kütle spektrometrisi (FAB-MS), elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi (ESI-MS), matris destekli lazer deiyonizasyon uçuş zamanlı (MALDI-TOF) ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometrisi (MALDI-MS) gibi kütle spektrometrisi (MS) yöntemleri kullanılır (Jo vd., 2017). Son zamanlarda, MALDI-TOF, ESI-MS ve dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometrisi (Q-TOF MS) gibi daha gelişmiş teknikler protein ve biyoaktif peptit karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoaktif peptit tekniklerinin izolasyonu, tanımlanması ve seçimi, öngörülen peptitlere bağlıdır (Begum vd., 2024).

2.6. Proteazların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları

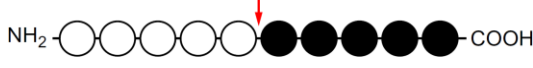
Proteolitik enzimler, proteazlar veya peptidazlar olarak da bilinir ve hidrolazlar grubunda bulunur. Proteolitik enzimler, farklı yoğunluk ve seçicilik derecelerine sahip peptit bağlarının hidrolizi yoluyla proteinlerin parçalanmasını katalize eder. Bir peptit bağı, bir amino asidin karboksil grubu ile başka bir amino asidin amino grubu arasındaki bağlantıdır. Proteazlar yapı ve etki mekanizmasında büyük çeşitliliğe sahiptir ve bu nedenle, genel enzimatik isimlendirme sistemiyle sınıflandırılmazlar; dolayısıyla, sınıflandırmaları peptit kesme bölgesine, aktif bölgede bulunan fonksiyonel gruba ve optimum pH değerine dayalı olabilir (Martínez-Medina vd., 2019). Peptidazların sınıflandırılması, enzimin aktif bölgesine bağlıdır. Bu nedenle, peptidazlar substratın N-terminallerinde (aminopeptidazlar) veya C-terminallerinde (karboksipeptidazlar) kesebilir (ekzopeptidazlar) veya bir polipeptit zincirinin uçlarında ve uçlarından uzakta bulunan peptit bağlarını kesebilir

(endopeptidazlar). Bu anlamda, ekzopeptidazlar EC Numarası aralığı 3.4.11 ila 3.4.19 arasında sınıflandırılırken, endoenzimler EC Numaraları 3.4.21 ila 3.4.99 arasındadır (Tablo 2.6). Bu iki alt grup, katalizde salınan amino asidin pozisyonuna ve katalitik bölgenin doğasına göre de alt sınıflandırılır (Souza vd., 2023).

Tablo 2.6. Proteazların sınıflandırılması (Martínez-Medina vd., 2019).

Proteaz	EC No.	Mekanizma	Hidroliz reaksiyonu
EKZOPEPTİDAZLAR			
Aminopeptidazlar	3.4.11		Kesme, polipeptidin amino veya karboksit terminaline yakın peptit bağında meydana gelir.
Dipeptidazlar	3.4.13		Kesme bir polipeptidin N-terminal ucunda meydana gelir.
Dipeptidil-dipeptidazlar	3.4.14		Dipeptitler için özel
Tripeptidil-peptidazlar	3.4.14		N-terminal polipeptitten bir dipeptitin salınmasıyla gerçekleşir.
Karboksipeptidazlar			N-terminal polipeptitten bir tripeptitin salınmasıyla gerçekleşir.
Serin tipi proteazlar	3.4.16		Kesme, bir polipeptidin C-terminal ucunda meydana gelir.
Metaloproteazlar	3.4.17		Serin aktif merkezi katalitik süreçte rol oynar.
Sistein tipi proteazlar	3.4.18		Katalitik mekanizmada bir metal iyonuna ihtiyaç vardır.
Peptidil dipeptidaz	3.4.15		Sistein aktif merkezi katalitik süreçte rol oynar.
Omega peptidazlar	3.4.19		Bir polipeptit zincirinde C-terminal ucunda dipeptit serbest bırakır
			İzopeptit bağlarıyla bağlanan N-terminal kalıntılarını serbest bırakır.

Tablo 2.6. (devamı) Proteazların sınıflandırılması

Proteaz	EC No.	Mekanizma	Hidroliz reaksiyonu
ENDOPEPTİDAZLAR	3.4.21–3.4.34		Kesme, polipeptit zincirinin iç bağlarında meydana gelir.
Serin endopeptidazlar	3.4.21		Serin aktif merkezi katalitik süreçte rol oynar.
Sistein endopeptidazlar	3.4.22		Sistein aktif merkezi katalitik süreçte rol oynar.
Aspartik endopeptidazlar	3.4.23		Aspartik aktif merkezi katalitik süreçte rol oynar.
Metalo endopeptidazlar	3.4.24		Katalitik mekanizmada bir metal iyonuna ihtiyaç vardır.
Bilinmeyen katalitik mekanizmaya sahip endopeptidazlar	3.4.99		Peptit bağı üzerinde etki eder.

Peptit zincirinin kesme bölgesi düşünüldüğünde, proteazlar dört gruba ayrılır.

1) Ekzopeptidazlar (3.4.11): Bir proteinin N veya C terminal ucundaki terminal peptit bağları üzerinde etki ederek serbest amino asitlerle sonuçlanır.

2) Endopeptidazlar (3.4.21–34): Bir proteinin iç peptit bağları üzerinde etki ederek kısa peptit zincirleriyle sonuçlanır.

3) Aminopeptidazlar (3.4.14): Polipeptit zincirinin serbest N-terminalinde etki ederek bir amino asit veya bir dipeptit veya tripeptit serbest bırakır.

4) Karboksipeptidazlar (3.4.16–3.4.18): Polipeptit zincirinin C-terminalinde etki eder ve katalitik mekanizmalarına ve aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruba bağlı olarak dört gruba ayrılır (Martínez-Medina vd., 2019).

Aktif bölgedeki fonksiyonel gruba göre proteazlar da dört belirgin gruba ayrılabilir.

1) *Serin proteazlar*: Bunlar aktif bölgede bir serin grubunun varlığıyla karakterize edilir. Ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar grubuna aittirler. Bu enzimler 3,4-dikloroizokumarin (3,4-DCI), diizopropilflorofosfat (DFP), fenil sülfonil metil sülfonil florür (PMSF) ve Tosil l-lizin klorometil keton (TLCK) tarafından geri döndürülemez şekilde inhibe edilir. Bazı serin proteazlar, aktif bölgenin yakınında sistein kalıntılarının bulunması nedeniyle p-Kloromerküribenzoat (PCMB) gibi tiyol gruplarını inhibe eden ajanlar tarafından inhibe edilir. Genellikle nötr ve alkali pH'ta aktiftirler ve optimumları 7 ile 11 arasındadır.

2) *Sistein proteazları*: Sistein proteazlarının aktivitesi, sistein ve histidinden oluşan katalitik bir ikiliye bağlıdır. Genellikle, bu enzimler yalnızca HCN veya sistein gibi indirgeyici ajanların

varlığında aktiftir. Sistein proteazları, nötr pH'ta maksimum aktiviteye sahiptir, PCMB gibi sülfidril ajanlarına duyarlıdır ancak DFP ve metal şelatlayıcı ajanlarla hiçbir etkileri yoktur.

3) *Aspartil proteazlar*: Genellikle asit proteazlar olarak bilinen bu enzimler endopeptidazlar grubuna aittir; katalitik aktiviteleri aspartik asit kalıntılarına bağlıdır. Bu enzimler pepstatin ile inhibe edilir. Ayrıca bakır iyonlarının varlığında Diazocetyl-dl-Norleucine Methyl Ester (DAN) ve 1,2-Epoxy-3 (p-nitrophenoxy) Propan (EPNP) gibi diazoketon bileşiklerine karşı hassastırlar.

4) *Metaloproteazlar*: Bu proteazların temel özelliği, aktiviteleri için iki değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duymalarıdır. Bu enzimler, EDTA gibi şelat oluşturan ajanlar tarafından inhibe edilir ancak sülfidril ajanlar veya DFP tarafından inhibe edilmez (Martínez-Medina et al., 2019).

Enzimlerin en büyük aktivitelerini gösterdikleri pH değerine göre proteazlar alkali, nötr ve asit proteazlar olarak sınıflandırılabilir. Asit proteazlar pH 2 ile 6 arasında en iyi aktiviteye sahiptir ve esas olarak aspartil proteazlar ile bazı sistein proteazları ve metaloproteazları içerir. 380-420 amino asitten oluşurlar ve aktif bölgeyi farklı amino asit kalıntıları oluşturur. Nötr proteazlar nötrlüğe yakın pH değerlerinde optimum aktiviteye sahiptir ve asidik koşullar altında aktiviteleri azalır. Bu sınıflandırma sistein proteazları, metaloproteazları ve bazı serin proteazları içerir. Alkali proteazlar pH 8-13 aralığında yüksek aktiviteye sahiptir ve zincirde yaklaşık 420-480 amino asit kalıntısı içerir. Bu sınıflandırmada serin proteazlar bulunabilir. Bu tür özelliklerle ilgili çalışma proteazlar için temeldir, çünkü endüstriyel süreçlerde uygulamaları bu enzimlerin özelliklerinin bilinmesine bağlıdır (Martínez-Medina vd., 2019).

Proteazlar arasındaki farklılıklar, hidrolize edilecek protein kaynağına veya öngörülen ürünlere göre proteaz seçimi için çok önemlidir. Aynı protein zinciri, farklı proteazlar kullanılarak çok farklı hidrolizatlar üretebilir. Örneğin, endoproteaz Alcalase ve Novo Pro-D, ekzo-peptidaz Corolase, Flavourzyme (endo ve ekzo-peptidaz karışımı) kullanılarak patates proteini dört farklı enzim ile hidrolize edildiğinde farklı hidrolizatlarla elde edilmiştir. Aynı enzim, örneğin farklı kaynaklardan gelen bir tripsin, farklı davranışlar gösterebilir. Koyun ve domuz pankreas tripsini, -laktoglobulin, yumurta beyazı lizozim, kazein veya peptit parçalarının oto-katalitik hidroliz üretimi için gözlemlendiği gibi çok benzer hidroliz davranışlar gösterebilir. Ancak, domuz tripsini düşük pH veya yüksek sıcaklıkta koyun tripsininden daha az denatürasyona duyarlıdır, bu da belirli bir uygulama için enzim seçimini etkileyebilir (Tavano, 2013).

Proteazlar hayvansal, bitkisel (veya sebze) ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. Hayvansal proteazlar arasında pankreas tripsini, kimotripsini, pepsin ve renin bulunur. Bitkisel kökenli proteazlar grubunda papain ve bromelain iyi örneklerdir; papain Carica papaya meyvesinin kabuğundan, bromelain ise ananasın gövdesinden ve suyundan çıkarılır. Ancak bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımı canlılık, yetiştirme ve iklim koşulları faktörleri ve uzun ekstraksiyon süreçlerinden büyük ölçüde etkilenir. Bu nedenle ticari açıdan önemli enzimlerin çoğu sınırlı sayıda mikroorganizmadan üretilir. Ayrıca, mikrobiyal enzimler daha çok tercih edilir. Çünkü genellikle bol miktarda ve aynı kalitede elde edilebilir. Mikrobiyal enzimler genellikle hayvansal ve bitkisel

benzerlerinden daha kararlıdır. Ayrıca, mikroorganizmaların kısa çoğalma süreleri ve nispeten basit besin gereksinimleri nedeniyle üretim süreçleri daha hızlıdır. Ayrıca, ilgi duyulan enzimin aktivitesini ve verimini artırmak için mikroorganizmaların genetik ve çevresel özellikleri değiştirilerek istenen özellikte enzim elde edilebilir (Martínez-Medina vd., 2019).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

CN Lab Nutrition Asian Group (Shaanxi, Çin) işletmesinden temin edilmiş olan %100 *Spirulina platensis* tozu çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Merck-106392), Gallik asit (Merck-842649), Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent (Merck-109001), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ; Merck-T1253), Iron(III) chloride hexahydrate (Merck-236489), Iron(II) sulfate heptahydrate (Merck-215422), Sodyum asetat trihidrat (Merck-106267), Acetic acid (Glacial; Merck-100063), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; D9132), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS; Sigma-10102946), Potassium peroxodisulfate (Merck-105092), Troloks (Merck-238813), Dializ selüloz membran (D-9277), Pepsin (Sigma-P7000), Pankreatin (Sigma-P1750), Safra ekstraktı (Sigma-B8631), Sodyum karbonat (Merck-222321), Alkalaz (Sigma-P4860), Papain (Sigma-P3250), Flavourzyme (Sigma-P6110), N-Hippuril-Histidin-Lösin Hidratı (Sigma-H4884; 25mg), Hippürik Asit (Sigma 112003), Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE-Sigma A6778; 2.0 unit), Sığır serum albümini (BSA; Sigma-9048-46-8), Hidroklorik asit (Merck-100317), Sülfürik asit (Merck-100731), Borik asit (Sigma- B6768), Acetonitrile (Sigma no:271004), Metanol (Merck-106009), Etanol (Merck-100983), Trifloroasetik Asit (Sigma-T6508), Trikloroasetik Asit (Sigma-T6399), Amonyum format (Sigma-798568), Sodyum hidroksit (Merck-106462), Hidrojen peroksit (Sigma-H1009), Kjeldhal katalizörü, Metil Red (Sigma-32654), Gallik asit (Merck-842649), Kateşin (Sigma-Aldrich C1251), Klorojenik asit (Merck-500590), Şirinjik asit (Sigma-Aldrich S6881), Kumarik asit (Sigma-Aldrich C9008), Mirisetin (Sigma-Aldrich 70050), Kuersetin (Merck-Q4951) ve İzoramnetin (Sigma-Aldrich 17794).

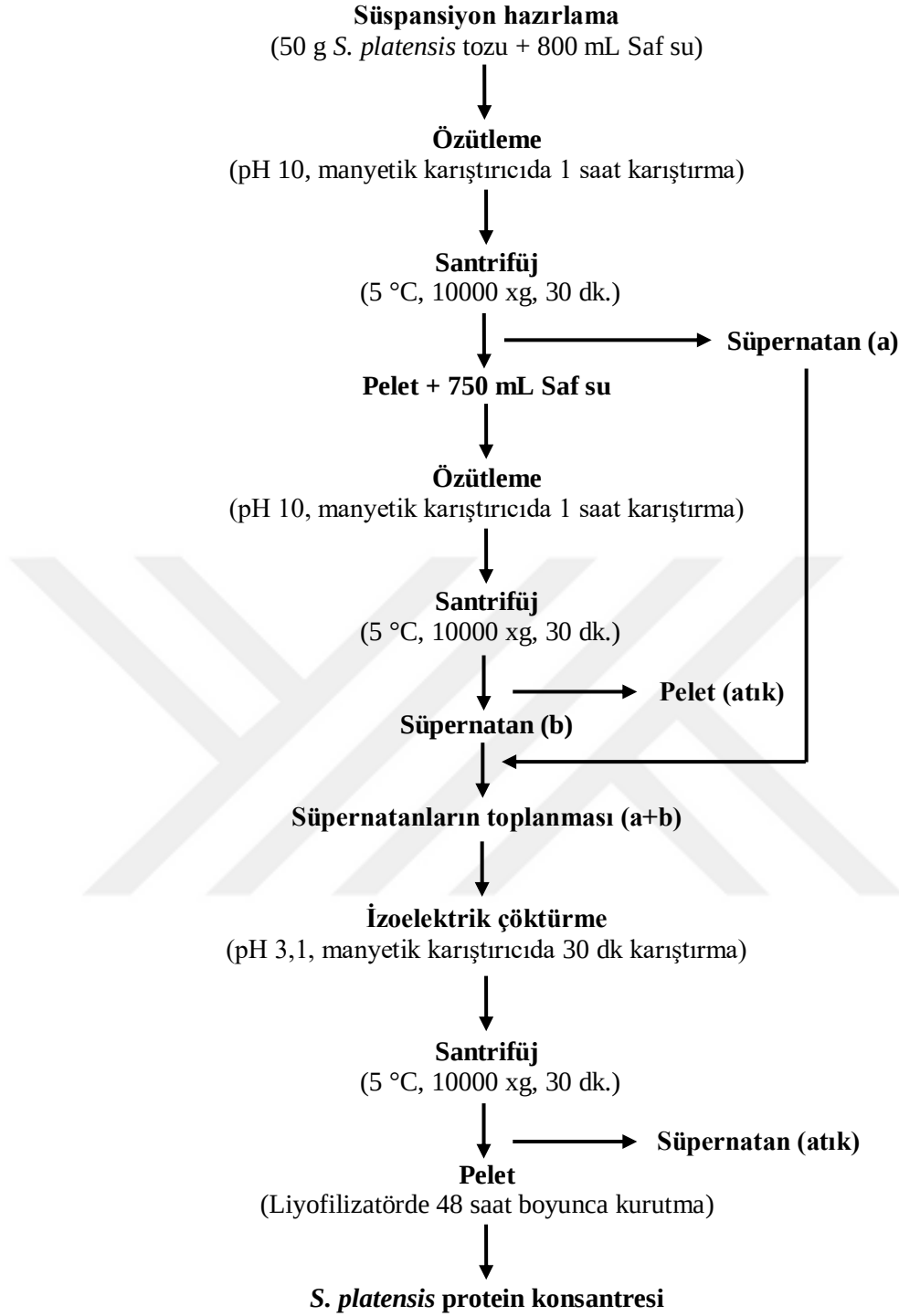
3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında, *S. platensis* mikroalginin protein ve protein hidrolizatlarının bazı biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Bu nedenle *S. platensis* tozundan alkali özütleme ve izoelektrik çöktürme yöntemine ile elde edilen protein konsantresi alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen enzimatik hidrolizatlar ve hidroliz olmamış kontrol örneği *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların protein içerikleri, hidroliz dereceleri, ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) inhibisyon etkileri, antioksidan aktiviteleri (FRAP, DPPH ve

ABTS) ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Ayrıca hidrolizatların fenolik bileşen profili ve hidrolizatlarda açığa çıkan peptitlerin molekül ağırlıkları da belirlenmiştir.

3.2.1. Protein Konsantresi Elde Edilmesi

Spirulina platensis tozundan alkali özütleme ve izoelektrik çöktürme yöntemiyle protein konsantresi elde edilmiştir (Arjeh vd., 2022). Protein konsantresi elde edilmesi için ilk önce *S. platensis*'in içerdiği yağ uzaklaştırılmış, daha sonra 50 g yağsız *S. platensis* tozu 800 mL destile su ile karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyonunun pH'sı 1N NaOH ile 10'a ayarlanmış ve 1 saat manyetik karıştırıcıda alkali özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Özütleme işleminden sonra 5 °C'de (10000 xg, 30 dk) santrifüj edilmiştir. Birinci santrifüj sonunda üstte kalan sıvı faz (süpernatant-a) alınıp, geriye kalan katı faz (pellet) 750 mL su ile karıştırılarak süspansiyon hazırlanmış ve pH 10'a ayarlanarak alkali özütleme işlemi ikinci defa tekrarlanmıştır. İkinci özütleme işleminden sonra 5 °C'de (10000 xg, 30 dk) santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı faz alınıp (süpernatant-b) birinci özütleme sonunda alınan sıvı faz (süpernatant-a) ile birleştirilmiştir. Birleştirilen sıvı fazların pH'sı 1 N HCl ile 3,1'e ayarlanmış ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırıldıktan sonra 5 °C'de (10000 xg, 30 dk) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı faz uzaklaştırılmış, geriye kalan katı faz ise protein konsantresi olup liyofilizatörde (Telstar Cryodos Model:230, -50 °C, İspanya) 48 saat boyunca kurutulmuştur. Şekil 3.1'de protein konsantresinin elde edilmesi akım şeması verilmiştir.

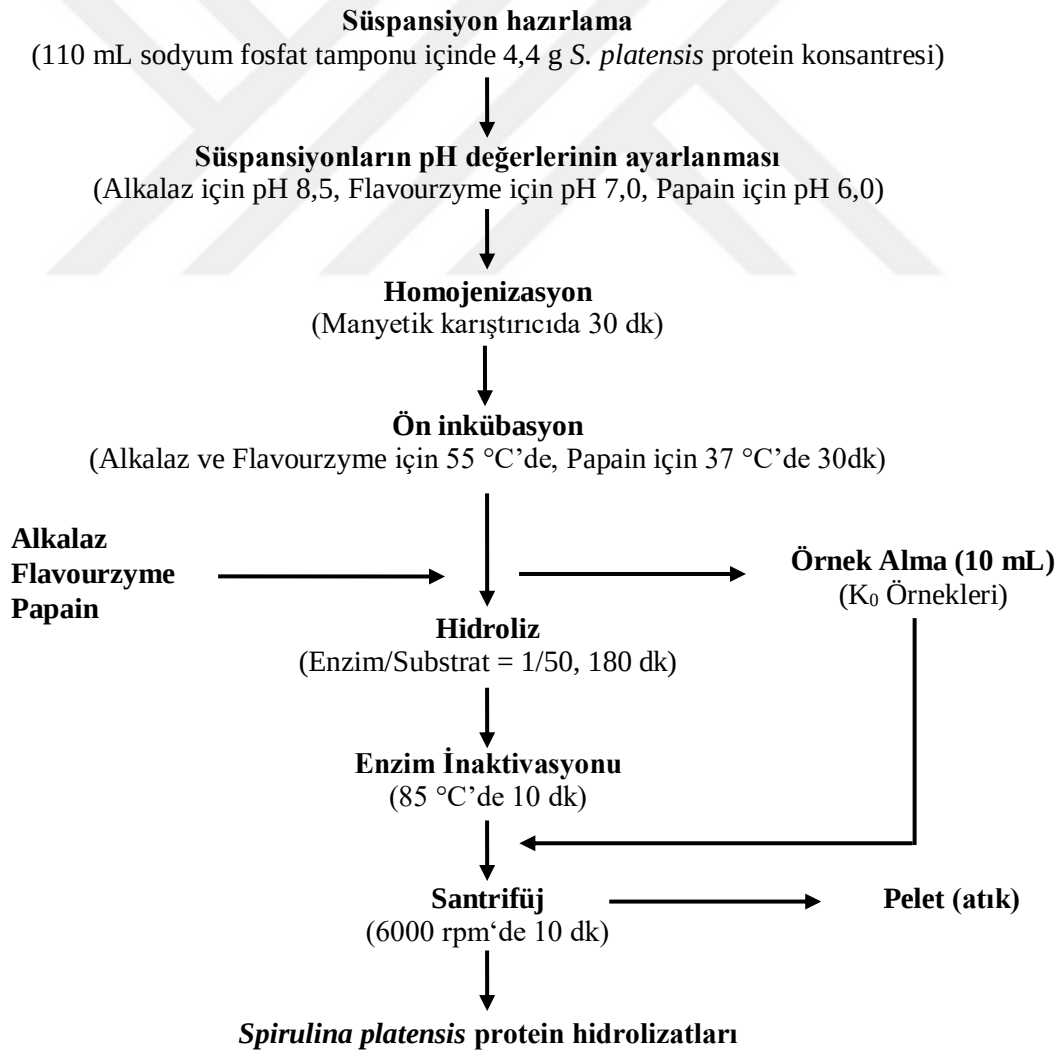


Şekil 3.1. *S. platensis* protein konsantresinin elde edilmesi

3.2.2. Enzimatik Protein Hidrolizi

Spirulina platensis protein hidrolizi, modifiye edilen Kim vd., (2014) yöntemine göre yapılmıştır. Protein hidrolizi, %4 oranında *S. platensis* protein konsantresi ile süspansiyon hazırlandıktan sonra kontrollü koşullar altında alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile gerçekleştirilmiştir.

Süspansiyonlar, 4,4 g *S. platensis* protein konsantresi tartılıp 110 mL sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,5) ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Alkalaz, flavourzyme ve papain enzimleri ile hidroliz için hazırlanan süspansiyonların pH değerleri sırasıyla 8,5, 7,0 ve 6,0 olarak ayarlandıktan sonra süspansiyonlar manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra alkalaz ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz için hazırlanan süspansiyonlar 55 °C'ye, papain enzimi ile hidroliz için hazırlanan süspansiyonlar ise 37 °C'de ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 30 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Hidrolizin başlamadan önce 10 mL kontrol örnekleri (K₀ örneği) alınmış ve sonrasında süspansiyonlara enzim/substrat (E/S) oranı 1/50 olacak şekilde enzim eklenerek hidroliz işlemi başlatılmıştır. Hidroliz işlemi 180 dakika boyunca gerçekleştirilmiş, sonrasında süspansiyonlar 85 °C'deki su banyosunda 15 dakika boyunca bekletilerek enzimler inaktive edilmiş ve hidroliz işlemi sonlandırılmıştır. Daha sonra, süspansiyonlar soğutulduktan sonra 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip sıvı faz alınarak daha sonra yapılacak analizler için -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Enzimatik protein hidrolizi akım şeması Şekil 3.2'de verilmiştir.

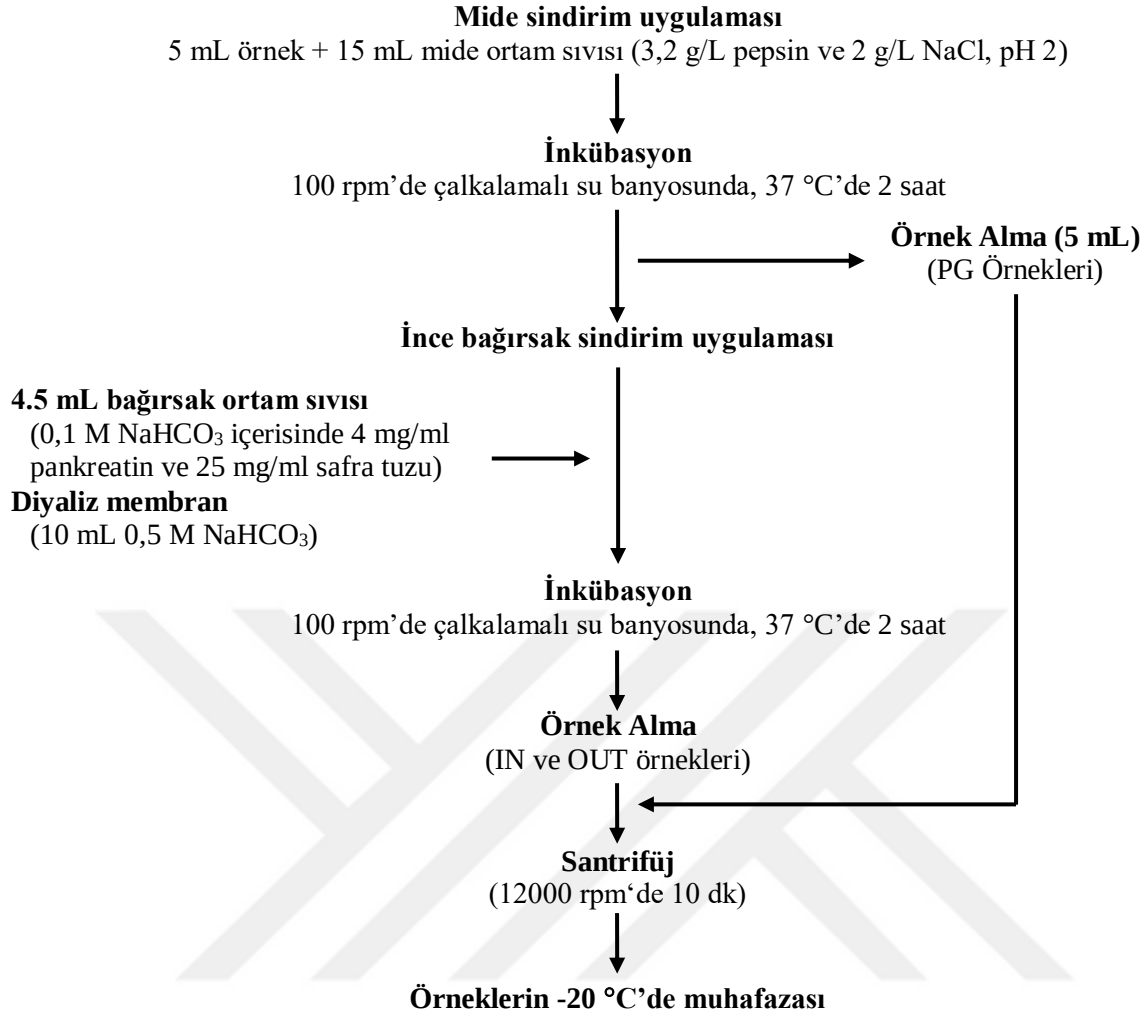


Şekil 3.2. *S. platensis* protein hidrolizatı üretimi

3.2.3. *In-vitro* Sindirim ve Biyoerişebilirlik

S. platensis protein konsantresinin alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidrolizi sonrası elde edilen hidrolizatlar ve hidroliz olmamış örnek, *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemi ile de hidroliz edilmiştir. Bu nedenle *in-vitro* gastrointestinal sindirim işleminin modellenmesi McDougall vd. (2005) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Model mide ve bağırsak ortamının simüle edilmesi ile oluşturulmaktadır. Şekil 3.3'te de gösterildiği gibi mide sindirimi uygulaması sonrası mide örneği (PG/Post Gastrik) ve ince bağırsak sindirim uygulaması sonrasında ise IN ve OUT olarak adlandırılan örnekler elde edilmiştir. IN; diyaliz tüpü içindeki örnek olup ince bağırsaktan kan dolaşım sistemine geçen fazı, OUT ise diyaliz tüpü dışındaki örnek olup ince bağırsakta kalan fazı temsil etmektedir.

Mide ortam sıvısı, 5 M HCl ile pH'sı 2'ye ayarlanmış 1 litre destile su içerisinde 3,2 g pepsin ve 2 g NaCl olacak şekilde hazırlanmıştır. 5 mL hidrolizat örnekleri 250 ml'lik beherlere aktarıldıktan sonra üzerine 15 mL mide sıvısı eklenerek mide sindirim uygulaması başlatılmış ve 37 °C'ye ayarlanmış 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışımlar buzlu suda soğutulmuş ve 5 mL PG örnekleri alınmıştır. Geriye kalan karışımların üzerine 4,5 mL bağırsak ortam sıvısı eklendikten sonra içinde 10 mL 0,5 M NaHCO₃ bulunan diyaliz membran bağırsak ortamının içerisine bırakılarak sindirim başlatılmıştır. İnce bağırsak sindirim uygulaması için hazırlanan karışımlar da 37 °C'de 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışımlar buzlu suda tekrar soğutulmuş ve IN ve OUT örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Bağırsak ortam sıvısı, 0,1 M NaHCO₃ içerisinde 4 mg/mL pankreatin ve 25 mg/mL safra tuzu olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. *İn-vitro* gastrointestinal sindirim modeli

3.2.4. Protein Analizi

Protein miktarı tayini Ambigaipalan vd., (2015) tarafından belirtilen Mikro-Kjeldahl analiz yöntemine göre yapılmıştır. Yöntem yakma, destilasyon ve titrasyon olmak üzere üç aşamadan oluşan yöntemin ilkesi örnekteki toplam azot miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Toplam azot miktarı belirlendikten sonra dönüşüm faktörü (6.25) kullanılarak protein miktarı hesaplanmaktadır. Protein analizine başlamadan önce analiz için gerekli olan %40'lık NaOH, %4'lük Borik Asit (H_3BO_3) ve 0,2 N HCl çözeltileri hazırlanmıştır. Analiz 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

Yakma işlemi; için öncelikle kjeldahl tüplerine kör hariç 0,28 gr örnek, 2,5 gr Kjeldahl tableti, 3 mL derişik sülfürik asit (%96'lık ve $d=1,84$) ve yakmayı hızlandırmak için 2 mL Hidrojen Peroksit (H_2O_2) eklenmiştir. Daha sonra tüpler yakma ünitesine yerleştirilip, 400 °C'de 3 saat süreyle yakma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yakılan örnekler soğutulduktan sonra destilasyon ünitesine yerleştirilmiştir. Cihazda destilatın toplandığı kısma içinde fenolftalein indikatörü (5 damla) bulunan erlen yerleştirilmiş ve 200 mL destilat elde edilinceye kadar destilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Destilasyonda elde edilen destilatın üzerine, örnek rengi pembe oluncaya kadar 0,2N HCl çözeltisi eklenerek titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekteki toplam azot ve protein miktarı aşağıdaki denklemler (3.2 ve 3.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Azot = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0,014}{m} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%Protein = \%Azot \times 6,25 \quad (3.3)$$

V_1 = Titrasyonda harcanan 0,2N HCl çözeltisi miktarı (mL)

V_0 = Kör deneme titrasyonunda harcanan 0,2N HCl çözeltisi miktarı (mL)

N = Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,2N)

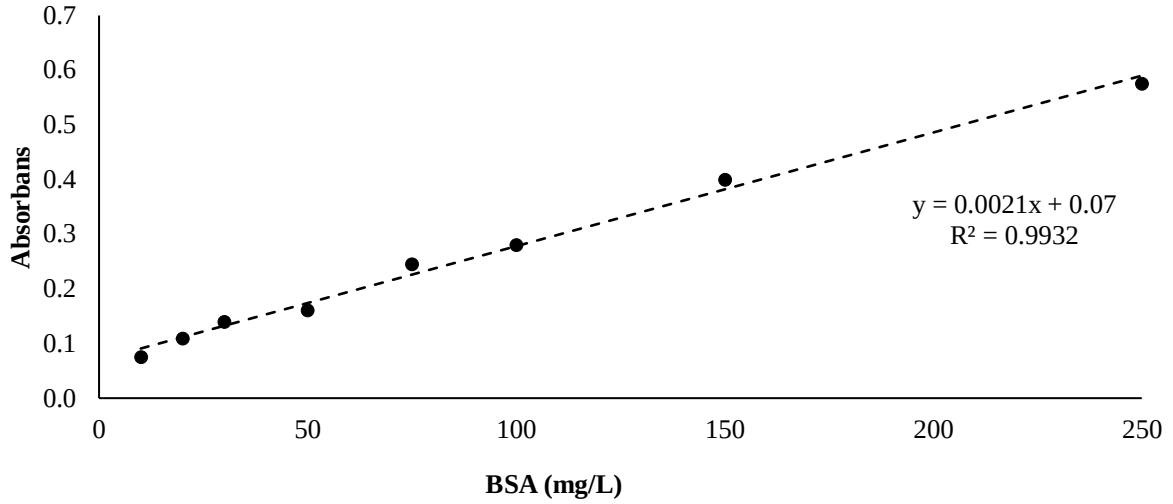
0,014 = Azotun mili ekivalent ağırlığı

m = Alınan örnek miktarı (g veya mL)

3.2.5. Hidroliz Derecesi (%HD)

Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi (%HD), Ng vd. (2013) tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. Yöntemin prensibi, örneğin %10'luk trikloroasetik asitte (TCA) çözünebilir protein içeriğinin belirlenmesine dayanmaktadır. 10 mL hidrolizat ile 10 mL %20 TCA karıştırılarak elde edilen %10 TCA karışımları 30 dakika inkübe edildikten sonra 4000 xg'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra toplanan süpernatantların çözünür protein içeriği Lowry yöntemine göre belirlendi (Lowry vd., 1951). Standart kalibrasyon (0-250 ppm) eğrisi sığır serum albümini (BSA) kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3.4). Hidrolizatların toplam protein içeriği, mikro-kjeldahl analiz yöntemine göre belirlendi (AACC, 2000). Hidroliz derecesinin (%HD) hesaplanmasında aşağıdaki denklem (3.4) kullanılmıştır.

$$\%HD = \left(\frac{10\% \text{ TCA'da Çözünen protein hidrolizatı}}{\text{Toplam Protein}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$



Şekil 3.4. Sığır serum albümini (BSA) için kalibrasyon grafiği.

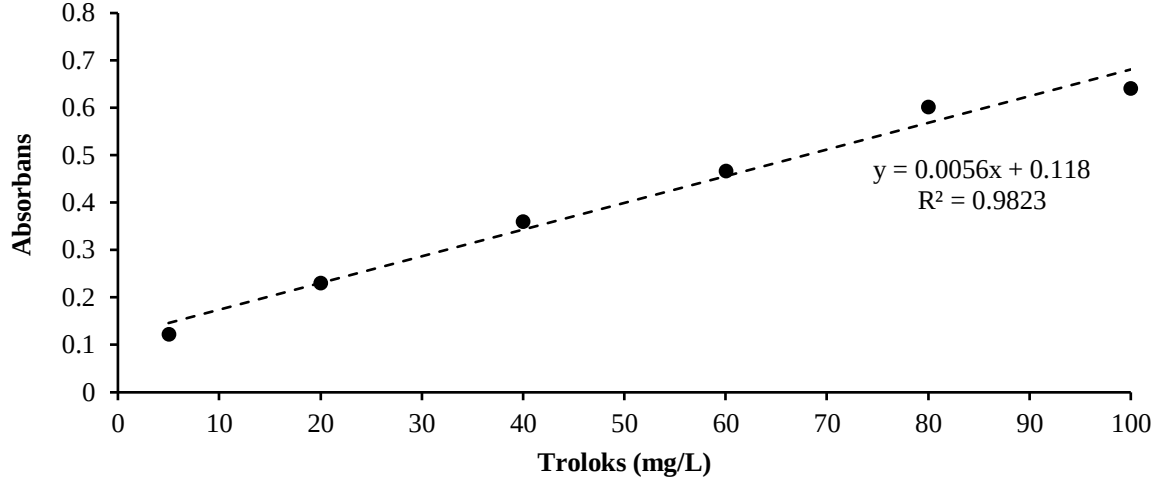
3.2.6. Antioksidan Aktivite Analizleri

S. platensis protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri; demir (III) iyonu (ferrik) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP), ABTS radikali süpürme kapasitesi ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme kapasitesi yöntemlerine göre belirlenmiştir.

3.2.6.1. Demir (III) iyonu (ferrik) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP)

Ferrik indirgeme gücü, Benzie ve Strain (1996) tarafından önerilen FRAP (Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç) yöntemine göre belirlenmiştir. FRAP yöntemi için; 0,3 M asetat tamponu (pH 3.6), 40 mM HCl içinde çözündürülmüş 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) ve 20 mM FeCl₃·6H₂O çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan asetat tamponu, TPTZ ve 20 mM Ferric çözeltileri 10:1:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak FRAP çözeltisi elde edilmiştir. TPTZ ve Ferric çözeltileri analizin yapıldığı gün hazırlanmıştır. Analiz için 200 µL örnek bir tüpün içerisine konulduktan sonra üzerine 1,8 mL FRAP çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 10 dakika boyunca 37 °C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda örneklerin, 593 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Agilent Technologies, Cary 60–UV-Vis, Malezya) absorbansları ölçülmüştür. Sonuçlar mg Trolox Eşdeğeri/g Kuru Madde (mg TE/g KM) cinsinden belirlenmiştir. Analiz 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

FRAP yöntemi için kullanılan kalibrasyon grafiği 5, 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm Trolox standartları hazırlanarak oluşturulmuştur (Şekil 3.5).

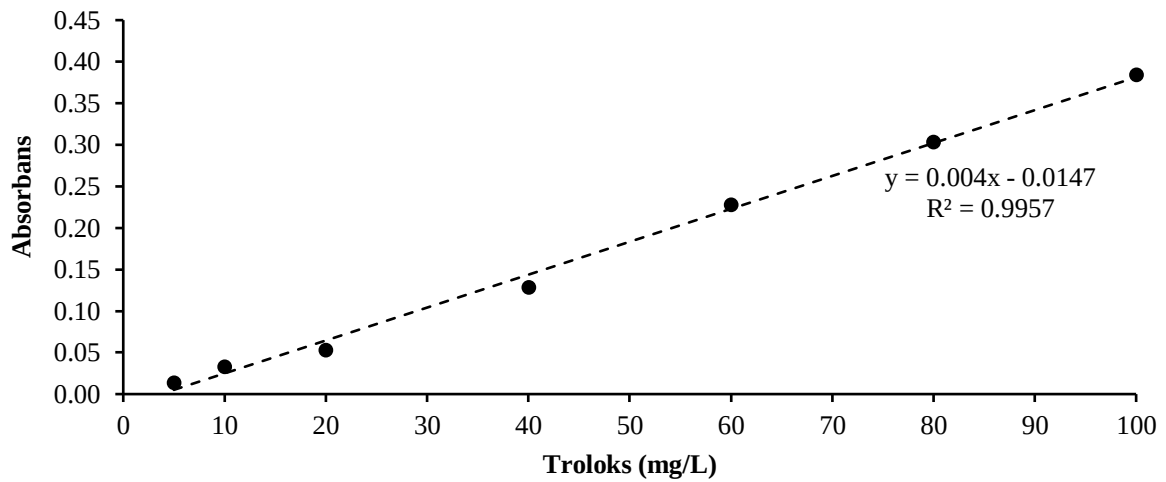


Şekil 3.5. FRAP yöntemi için troloks kalibrasyon grafiği.

3.2.6.2. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali süpürme kapasitesi Barreca vd. (2011) yöntemine göre belirlenmiştir. Analizde kullanılan metanolik DPPH çözeltisi 0,04 mM olacak şekilde analizin yapıldığı gün hazırlanmışlar. Yönteme göre; 2 mL DPPH çözeltisi ve 100 µL örnek karıştırıldıktan sonra karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra karışımların absorbansları 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede belirlenmiştir. Sonuçlar mg Troloks Eşdeğeri/g Kuru Madde (mg TE/g KM) cinsinden belirlenmiştir. Analiz 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

DPPH yöntemi için kullanılan kalibrasyon grafiği 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm Troloks standartları hazırlanarak oluşturulmuştur (Şekil 3.6).

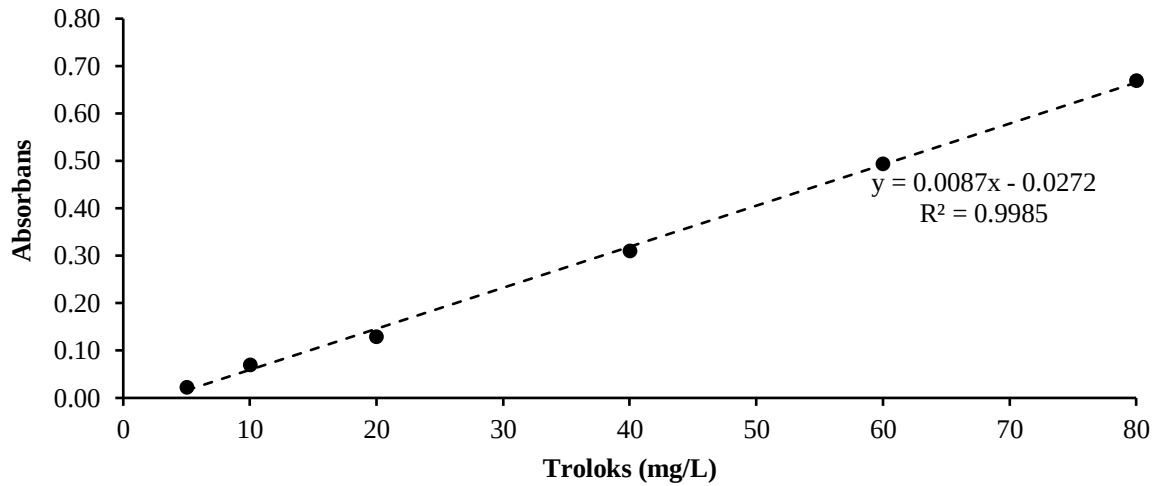


Şekil 3.6. DPPH yöntemi için troloks kalibrasyon grafiği.

3.2.6.3. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) (ABTS-radikal süpürme aktivitesi)

TEAC yöntemi, Re ve arkadaşları (1999) tarafından açıklanan ABTS radikal katyonu ($ABTS^+$) temizleme aktivitesinin yöntemine göre belirlenmiştir (Re et al., 1999). Bu yöntemde suda çözünmüş 7 mM ABTS ile 2,45 mM potasyum persülfatın oda sıcaklığında 16-18 saat süreyle karanlıkta reaksiyonu sonucu $ABTS^+$ reaktifi oluşması sağlanmıştır. Reaksiyondan sonra oluşan $ABTS^+$ çözeltisi 734 nm'deki absorbansı değeri 0,70 olacak şekilde metanol ile seyreltilmiştir. Daha sonra 100 μ L örnek, 1 mL $ABTS^+$ çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlıkta 6 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda karışımların absorbansları spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Sonuçlar mg Troloks Eşdeğeri/g Kuru Madde (mg TE/g KM) cinsinden belirlenmiştir. Analiz 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

DPPH yöntemi için kullanılan kalibrasyon grafiği 5, 10, 20, 40, 60 ve 80 ppm Troloks standartları hazırlanarak oluşturulmuştur (Şekil 3.7).

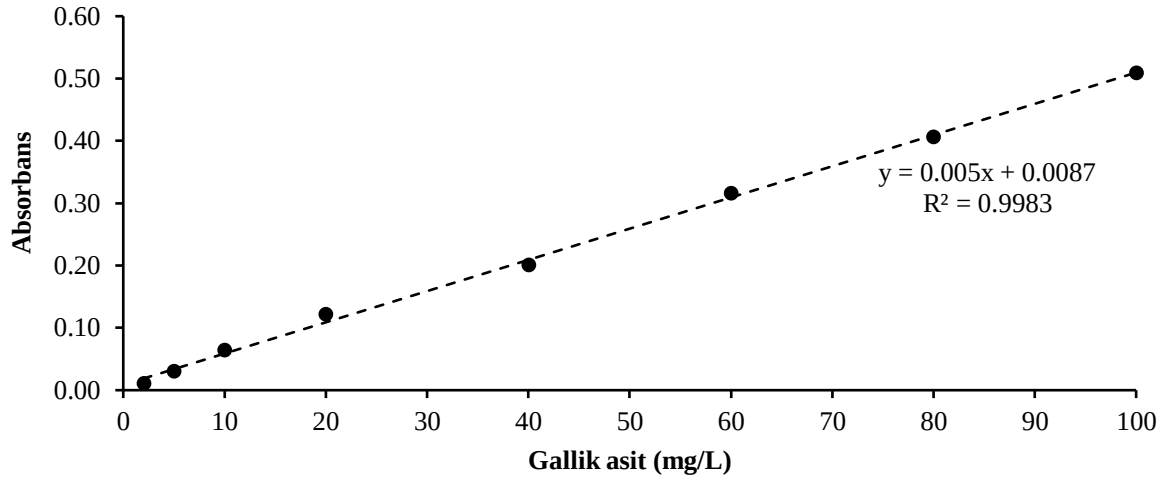


Şekil 3.7. TEAC yöntemi için troloks kalibrasyon grafiği.

3.2.7. Toplam Fenolik Madde Analizi

S. platensis protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı, Velioglu vd. (1998) tarafından tarif edilen yöntemle göre Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde önce 200 μ L örnek ve 1,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (destile su ile 10 kat seyreltilmiş) karıştırılmış, 5 dakika sonra da karışıma 1,5 mL %6'lık sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar oda sıcaklığında 90 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiş ve sonrasında karışımların spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda absorbansları belirlenmiştir. Gallik asit kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve sonuçlar mg Gallik asit eşdeğeri /g Kuru Madde (mg GAE/g KM) cinsinden verilmiştir. Analiz 3 paralelli olacak şekilde yapılmıştır.

Örneklerin toplam fenolik madde miktarını belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafiği 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm gallik asit standartları hazırlanarak oluşturulmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Gallik asit kalibrasyon grafiği.

3.2.8. ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) İnhibisyon Analizi

S. platensis protein hidrolizatlarının ACE (Anjiyotensin-I-Dönüştürücü enzim) inhibisyon etkisi, Wu ve Ding (2002) tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. Yöntemin temeli, inhibitör varlığında ACE'nin aktivitesine bağlı olarak N-Hippuril-Histidin-Lösin'den (HHL) oluşan Hippürik Asit (HA) miktarının HPLC'de belirlenmesine dayanmaktadır. Çalışmada inhibitör kullanılmadan ACE varlığında HHL'in, %100 HA'ya dönüştüğü varsayılmış ve bu örnekler "Kontrol Örneği" olarak adlandırılmıştır. Çalışmada, inhibitör kullanılarak ACE'nin % inhibisyonunun araştırıldığı örnekler "İnhibitör Örneği" olarak adlandırılmıştır. İnhibitör ve ACE kullanılmadığı için HA'nın oluşmadığı örnekler ise "Kör Örnek" olarak adlandırılmıştır.

Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatlar inhibitör olarak kullanılmıştır. HA, HHL ve ACE çözeltileri, 300 mM NaCl içeren pH 8,3 100 mM borat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. HA çözeltisi 5 mM, HHL çözeltisi 2 mM ve ACE çözeltisi 50 mU/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

ACE inhibisyon analizine başlamadan önce 2 mL'lik ependorf tüpünde bulunan 40 µL inhibitör örneğinin üzerine 200 µL HHL çözeltisi eklenip karıştırılmış ve sonrasında karışım 37 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 15 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Aynı şekilde ACE çözeltisi de enzim aktivasyonu için 37 °C'de 15 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda inhibitör+HHL karışımının üzerine 40 µL ACE çözeltisinden (2 mU) eklenmiş ve örnek 1 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda 37 °C de inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda karışımın üzerine 100

μL 1M HCl eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Daha sonra karışım örnekleri 0,45 mikronluk teflon filtreden geçirilerek örneklerde açığa çıkan HA miktarı HPLC’de belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan, kontrol ve kör örneklerinde inhibitör yerine borat tamponu (100 mM, pH 8,3) kullanılmıştır. Ayrıca kör örneklerinde ACE çözeltisi yerine de borat tampon kullanılmıştır. Kontrol, inhibitör ve kör örneklerinin içerikleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kontrol, inhibitör ve kör örneklerinin içerikleri.

Örnek Adı	Substrat Miktarı	Enzim Miktarı	İnhibitör Miktarı
Kontrol Örneği	200 μL 2mM HHL	40 μL 2mU ACE	40 μL Tampon çözeltisi
İnhibitör Örneği	200 μL 2mM HHL	40 μL 2mU ACE	40 μL İnhibitör
Kör Örneği	200 μL 2mM HHL	40 μL Tampon çözeltisi	40 μL Tampon çözeltisi

HHL hidrolizinden sonra açığa çıkan HA miktarı HPLC-DAD (Shimadzu-20 AD, Japonya) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. HPLC koşulları aşağıdaki gibidir. HPLC kromatogramında HA ve HHL’e ait alıkonma zamanları verilmiştir (Şekil 3.10).

Mobil Faz : A) %0,05 Trifloroasetik Asit (TFA) + %99,95 H₂O

: B) %0,05 TFA + %99,95 Asetonitril

Kolon : Perkin Elmer C18 Column (4,0X150 mm, 5 μm , ABD)

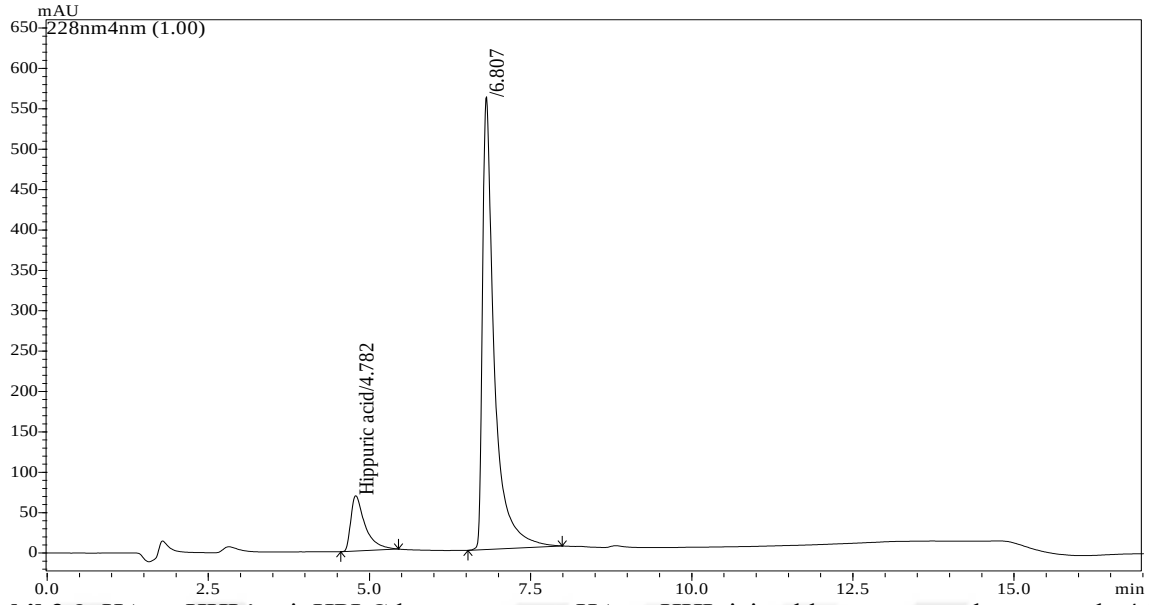
Akış hızı : 0,7 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi : 10 μL

Dalga boyu : 228 nm

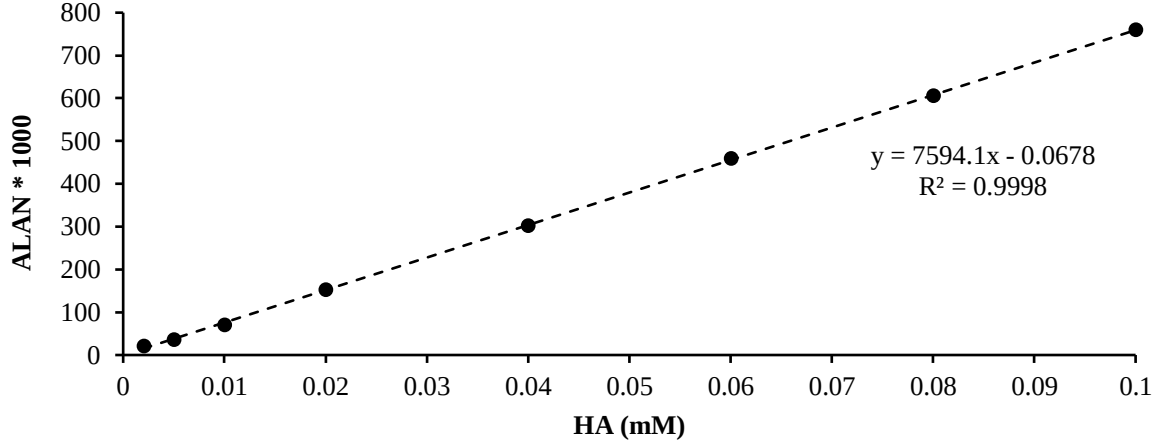
Dedektör : DAD (Diode Array Detector)

Dereceli Elüsyon :	Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
	0	95	5
	10	40	60
	12	40	60
	13	95	5
	17	95	5



Şekil 3.9. HA ve HHL'e ait HPLC kromatogramı. HA ve HHL için alıkonma zamanları sırasıyla 4,78 ve 6,81 dakikadır.

HA kalibrasyon grafiği (Şekil 3.9) için; 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 ve 0,1 mM HA şeklinde 8 farklı konsantrasyonda standart çözeltisi hazırlanmış ve sonrasında hazırlanan standart çözeltilerin HPLC okuması yapılarak elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Hippürük asit kalibrasyon grafiği.

3.2.9. Fenolik Bileşen Analizi

Spirulina platensis protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri gallik asit, kateşin, klorojenik asit, şirinjik asit, kumarik asit, mirisetin, kuarsetin ve izoramnetin fenolik standartları kullanılarak HPLC-DAD (Shimadzu-20 AD, Japonya)'de incelenmiştir. Analiz için kullanılan fenolik standartların uygun dalga boyunda HPLC okuması yapılarak alıkonma zamanları belirlenmiştir (Tablo 3.2). Daha sonra fenolik standartlar karışım halinde ve konsantrasyonları 1000 ppm olacak şekilde

stok olarak hazırlanmıştır. Fenolik stok karışımı kullanılarak 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 ppm şeklinde 8 farklı konsantrasyonda fenolik karışım çözeltisi hazırlanmış ve sonrasında çözeltilerin HPLC okuması yapılmış ve her fenolik standardı için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. HPLC’de belirlenen fenolik standartlara ait kromatogramlar Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’te verilmiştir. Fenolik bileşen analizi için HPLC koşulları aşağıdaki gibidir.

Mobil Faz : A) %0.05 Trifloroasetik Asit (TFA) + %99.95 H₂O

: B) %0.05 TFA + %99.95 Metanol

: C) %0.05 TFA + %99.95 Asetonitril

Kolon : INTERSIL ODS-3 (4.6X250 mm, 5µm, Japan)

Akış hızı : 1.0 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi : 10 µL

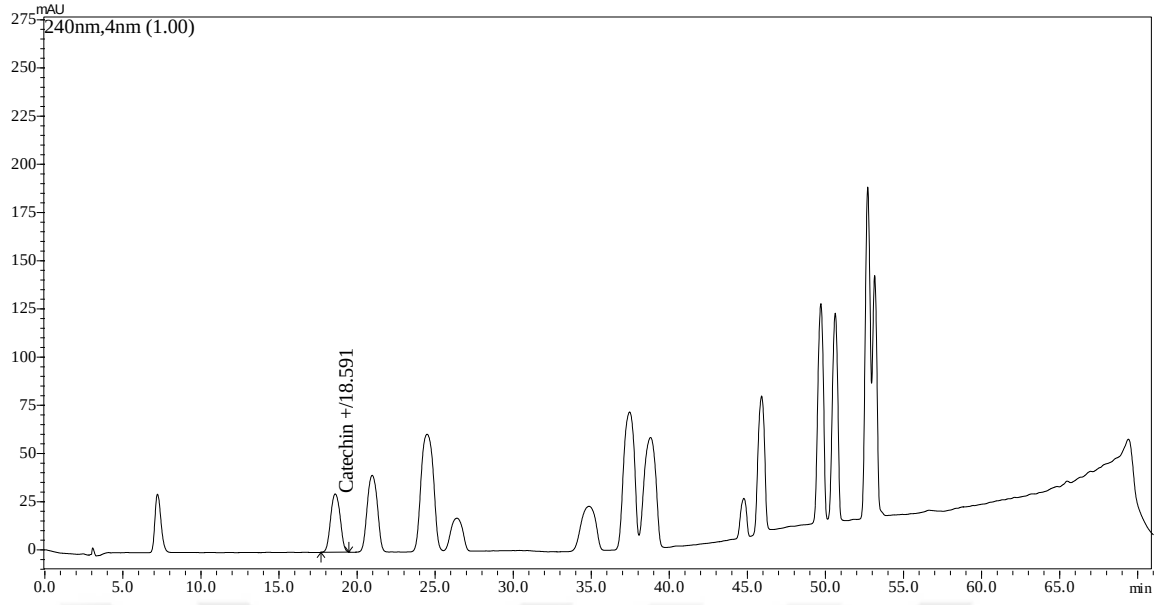
Dalga boyu : 240, 280, 320 ve 360 nm

Dedektör : DAD

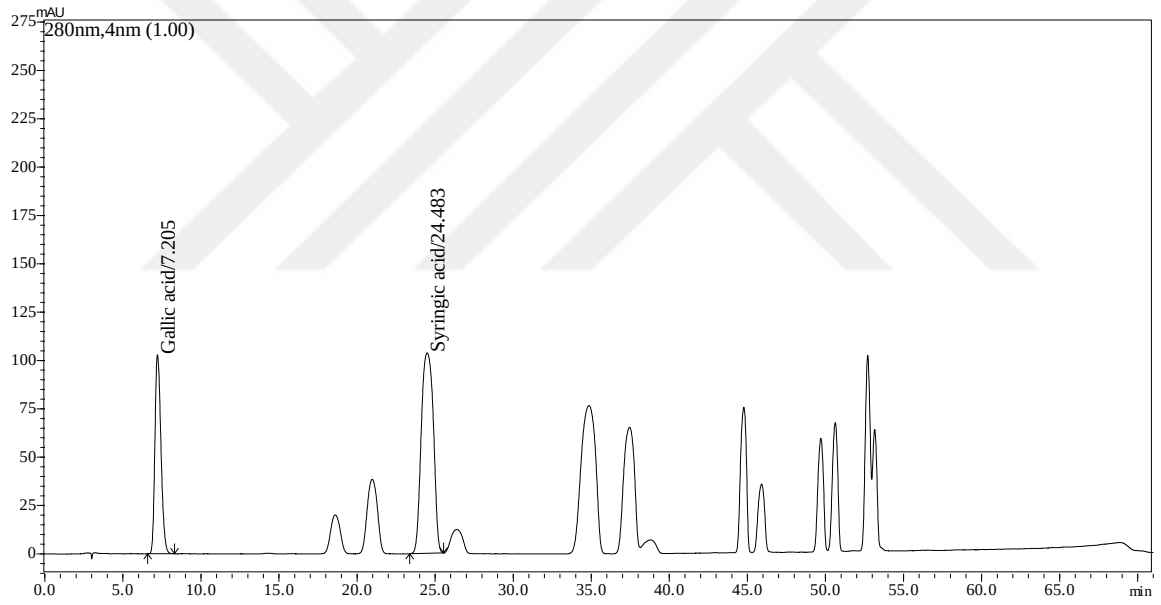
Dereceli Elüsyon :	Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Mobil Faz C (%)
	0	90	6	4
	5	85	9	6
	30	75	15	10
	65	0	85	15
	72	90	6	4

Tablo 3.2. HPLC’de belirlenen fenolik standartlara ait alıkonma zamanları ve dalga boyları.

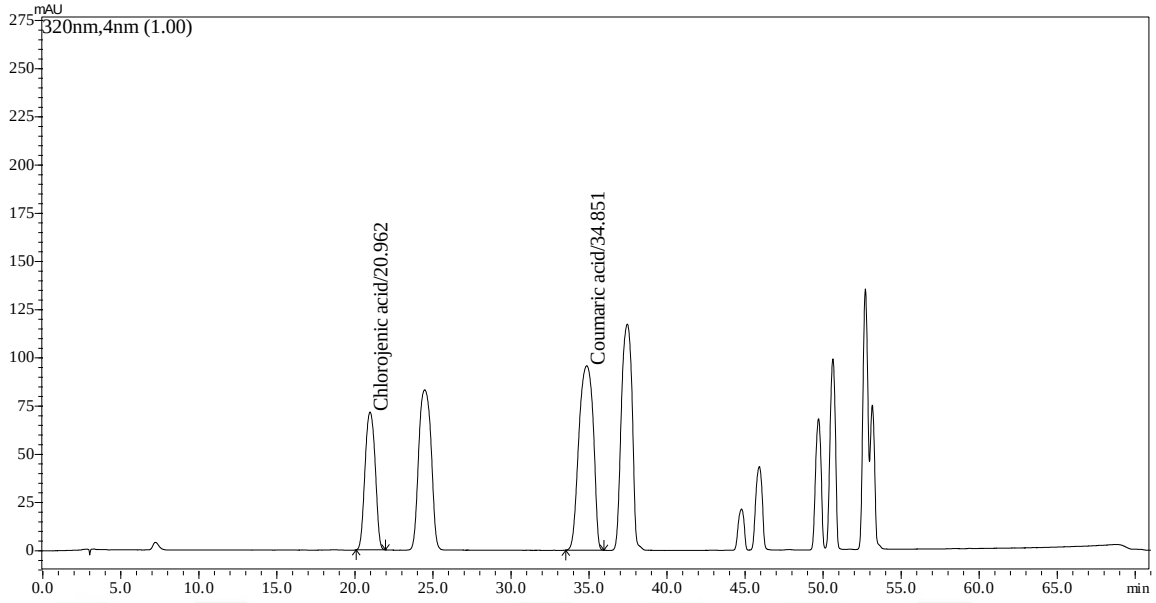
Fenolik STD	Alıkonma zamanı (dk)	Dalga boyu
Gallik asit	7,14	280
Kateşin	18,41	240
Klorojenik asit	20,80	320
Şirinjik asit	24,28	280
Kumarik asit	34,61	320
Mirisetin	45,80	360
Kuarsetin	49,62	360
İzoramnetin	53,08	360



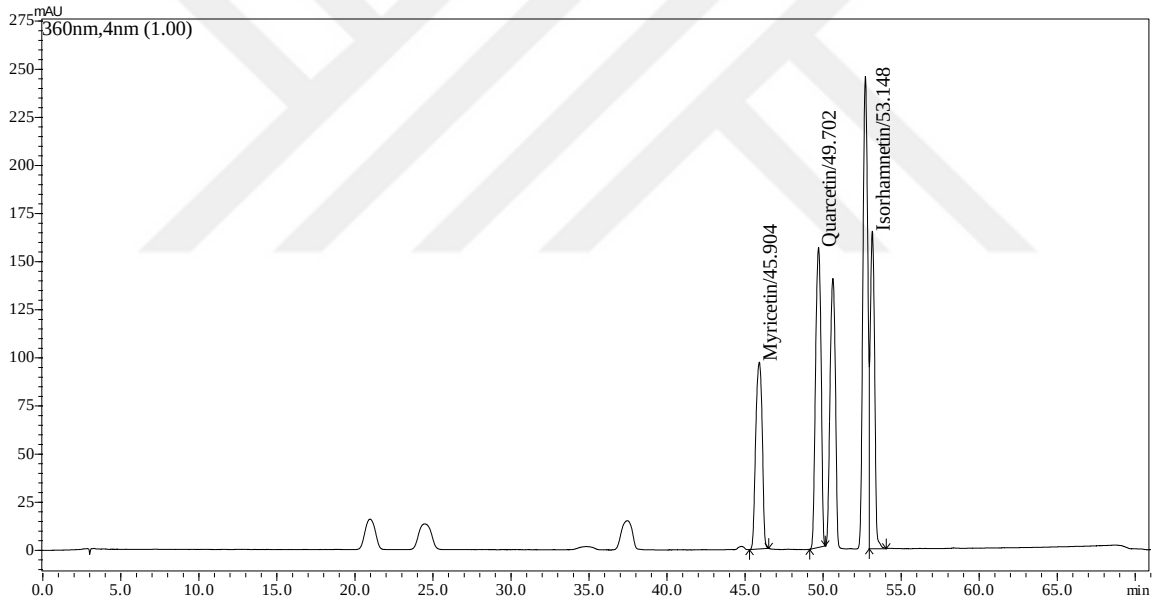
Şekil 3.11. Kateşin standartına ait 240 nm’deki HPLC kromatogramı.



Şekil 3.12. Gallik asit ve şirinjik asit standartlarına ait 280 nm’deki HPLC kromatogramı.



Şekil 3.13. Klorojenik asit ve kumarik asit standartlarına ait 320 nm'deki HPLC kromatogramı.



Şekil 3.14. Mirisetin, kuarsetin ve izoramnetin standartlarına ait 360 nm'deki HPLC kromatogramı.

3.2.10.LCMS IT-TOF İle Peptitlerin Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

S. platensis proteinlerinin enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası açığa çıkan peptitlerin molekül ağırlıkları LCMS IT-TOF (Shimadzu, Japonya) ile belirlenmiştir. LC-MS koşulları aşağıdaki gibidir.

Mobil Faz : A) %98 H₂O + %2 Asetonitril + %0,1 Amonyum format
 : B) %20 H₂O + %80 Asetonitril + %0,1 Amonyum format

Kolon : INTERSIL C18 (2.1X100 mm, 3µm)

Akış hızı : 0,10 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi : 5 µL

Kütle/yük (m/z) : 200-2000 (+ iyon)

Kolon sıcaklığı : 40 °C

Dereceli Elüsyon :	Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
	0,0	95	5
	5,30	95	5
	5,40	77	23
	10,00	71	29
	12,00	62	38
	13,00	52	48
	14,00	0	100
	18,00	0	100
	21,00	95	5

3.2.11.İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçların istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 22 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Ortalama değerler arasında önemli bir fark olup olmadığı Tukey testi ile analiz edildi ($p < 0,05$).



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Birçok biyoaktif peptidin, farklı gıda proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile üretildiği ve biyolojik aktiviteleri hidroliz sürecine bağlı olduğu bildirilmiştir (Barkia vd., 2019). Bu nedenle proteolitik enzimlerin türü ve reaksiyon süresi gibi hidroliz parametreleri, peptitlerin daha yüksek biyoaktif özellikler (örneğin antioksidan ve antihipertansif etkiler) göstermesi için önemlidir. Bu tez çalışmasında *S. platensis* proteini alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz edildikten sonra *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların; hidroliz derecesi, ACE inhibisyon etkisi, antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Ayrıca hidrolizatların fenolik bileşen profili ve hidrolizatlarda açığa çıkan peptitlerin molekül ağırlıkları da belirlenmiştir.

4.1. *S. platensis* Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi (HD)

S. platensis protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi; %10 trikloroasetik asit çözeltisindeki çözünür protein konsantrasyonunun, toplam protein konsantrasyonuna oranı olacak şekilde hesaplanmıştır. *Spirulina* protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Hidroliz derecesi, peptit bağlarının kopması ve karmaşık proteinlerin daha küçük peptitlere parçalanması açısından enzimatik hidrolizin kapsamını inceleyen bir göstergedir. Enzim türü ve konsantrasyonunun yanı sıra reaksiyon parametrelerinin, üretilen serbest amino gruplarının sayısı üzerindeki etkisine dair bir fikir verir (Sharma vd., 2024). Tez çalışmasında, farklı enzimler kullanarak *S. platensis*'ten elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri incelendiğinde; kontrol örneği (K_0) hidroliz olmamasına rağmen %3,72 oranında en düşük hidroliz derecesine sahip olduğu gözlenmiştir. Hidroliz öncesinde gözlenen bu değer, *S. platensis* protein konsantresi ile hazırlanan süspansiyondaki çözünmüş proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz sonrası elde edilen A_0 , P_0 ve F_0 hidrolizatlarının K_0 örneğine göre hidroliz derecesinde artış olduğu gözlenmiştir. A_0 , P_0 ve F_0 hidrolizatlarının hidroliz dereceleri sırasıyla %9,18, %7,81 ve %5,97 olarak bulunmuştur. K_0 , A_0 , P_0 ve F_0 örneklerinin hidroliz dereceleri istatistiksel olarak incelendiğinde, değerler arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

S. platensis proteininin hidrolizinde kullanılan alkalaz, papain, flavourzyme ve gastrointestinal proteazlar, biyoaktif peptitlerin üretimi için en yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerin yapı ve etki mekanizması farklı olduğu için, farklı tipte peptitlerin açığa çıkmasına neden olur. Bu durum elde edilen hidrolizatların biyoaktif özelliklerinde ve hidroliz derecelerinde de önemli farklılıklara neden olur. Tez çalışmasında kullanılan enzimlerin özellikleri aşağıda anlatılmıştır.

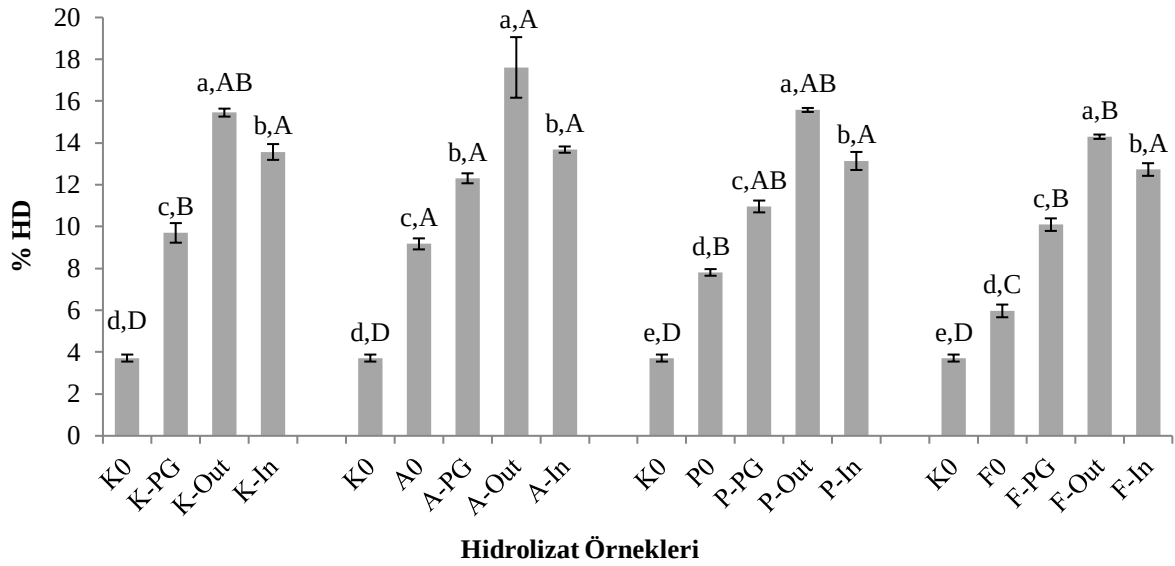
Alkalaz (EC 3.4.21.14), *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen bir serin endopeptidazdır. Alkalaz polipeptit zincirinin ortasından peptit bağlarını keser ve bu da çoğunlukla peptitlerin açığa

çıkmasını sağlar (Carvalho Oliveira vd., 2024). *Aspergillus oryzae*'den elde edilen Flavourzyme (EC 3.4.11.1), polipeptit zincirini her iki uçtan ve ortasından peptit bağlarını keserek hem endopeptidaz hem de ekzopeptidaz aktivitesi gösterir (Harnedy ve FitzGerald, 2013; Sharma vd., 2024). Ayrıca, Flavourzyme sekiz enzim (iki aminopeptidaz, iki dipeptidil peptidaz, üç endopeptidaz ve bir α -amylase) ile protein hidrolizi için yaygın olarak kullanılan bir peptidaz preparatıdır (Otero ve Verdasco-Martín, 2023). Alkalaz protein hidrolizatları üretmek için yaygın olarak kullanılırken, Flavourzyme acılaştırma ve hidrolizatların üretimi için kullanılır (Ambigaipalan vd., 2015). Ayrıca, Alkalaz hidrofobik amino asit açısından zengin peptitleri elde etmek için yaygın olarak kullanılırken, Flavourzyme hidrofilik peptitlerin üretimi için kullanılır (Sharma vd., 2024). Papain (EC 3.4.22.2), papaya bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen bir sistein endopeptidazdır. Proteolitik aktivitesiyle bilinen papain, kısa zincirli peptitleri, proteinleri, esterleşmiş amino asitleri ve amid bağlarını etkili bir şekilde parçalar. Papain, pozitif yüklü amino asitlerin, özellikle lizin, arginin ve fenilalanin kalıntılarının peptit bağlarını hedefler ve keser (Benito-Vázquez vd., 2024). Gastrointestinal proteazlar olan tripsin, kimotripsin ve pepsin spesifik endopeptidazlardır. Pepsin (EC 3.4.23.1), esas olarak hidrofobik ve aromatik amino asitleri içeren peptidik bağları kıran bir aspartik endopeptidazdır; bu nedenle terminal grubu prolin, triptofan, fenilalanin veya tirozin gibi bir hidrofobik ve / veya aromatik amino aside sahip peptitler üretir (Boschin vd., 2014). Tripsin (EC 3.4.21.4), lizin ve arginin amino asitlerinin pozitif yüklü yan zincirleri için spesifik bir bağlanma özelliğine sahip bir serin endopeptidazdır. Tripsinin kesme yeri, amino asit kalıntılarının C-terminal tarafındadır. Hidroliz, kesme yerinin her iki tarafında asidik amino asitlerin varlığıyla azalır. Kesme yerinin karboksil tarafında bir prolin kalıntısı mevcutsa, kesme gerçekleşmez. Kimotripsin (EC 3.4.21.1), tripsinin 15 ve 16. kalıntılardaki (arginin ve izolösin) bağı kesmesiyle aktive olan başka bir serin endopeptidazdır. Kimotripsin, tirozin, fenilalanin ve triptofanın L-izomerleri gibi hidrofobik amino asit kalıntılarındaki molekülleri parçalayarak proteinlerin hidrolizini katalize eder. Ayrıca, duyarlı amino asitlerin amidleri ve esterleri üzerinde etki etme yeteneğine de sahiptir (O'Connor vd., 2022).

Enzimlerin türü, aktivitesi ve konsantrasyonu, proteinin başlangıçtaki doğallık/denatürasyon derecesi, ortam koşulları (T, pH, iyonik güç) ve hidroliz süresi gibi çeşitli parametreler hidroliz derecesini etkiler (Panyam ve Kilara, 1996). Serin endopeptidaz olan alkalaz, çeşitli protein substratlarında genellikle en yüksek hidroliz derecesi verdiği bildirilmiştir. Ahmadifard vd., (2016), pirinç kepeği protein konsantresi ve soya fasulyesi proteininin enzimatik hidrolizinde alkalaz, papain, tripsin, kimotripsin ve aminopeptidazın hidroliz derecesi arasında bir karşılaştırma yapmışlar. Sonuçlar, alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizatların daha yüksek hidroliz derecesine sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, *Arthrospira platensis* proteininden alkalaz, papain, pepsin ve fisin enzimleri ile elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi incelenmiştir. En yüksek hidroliz derecesi alkalaz hidrolizatında bulunmuştur (Villaró vd., 2023). Yapılan başka bir çalışmada *A. platensis* fikobiliproteinlerinin farklı enzimlerle hidrolizi sonrası hidroliz derecesi incelenmiştir. Çalışmada, 6 saat hidroliz işlemi sonrası pepsin, tripsin, alkalaz, papain ve bromelain hidrolizatların hidroliz

derecesi sırasıyla %11,89, %16,04, %31,56, %31,50 ve %21,63 olarak bulunmuştur. Alkalaz ve papain hidrolizatları en yüksek hidroliz derecesine göstermiştir (Liu vd., 2022). Tez çalışmasında, enzimatik hidrolizatlar arasında en yüksek hidroliz derecesi alkalaz enzimi ile elde edilen A0 örneğinde bulunmuş ve yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu bulunmuştur.

K₀, A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının *in-vitro* sindirim işleminde mide sindirim fazı sonrası sırasıyla K-PG, A-PG, P-PG ve F-PG hidrolizatları elde edilmiştir. İnce bağırsak sindirim fazı sonrası elde edilen hidrolizatlar ise; ince bağırsaktan dolaşım sistemine geçenler sırasıyla K-In, A-In, P-In ve F-In olup, ince bağırsakta kalanlar K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out şeklindedir.



Şekil 4.1. *S. platensis* protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (%HD) değerleri.

K₀ (Kontrol örneği); A₀ (Alkalaz hidrolizatı); P₀ (Papain hidrolizatı); F₀ (Flavourzyme hidrolizatı);

PG (Mide hidrolizatı); Out (İnce bağırsak hidrolizatı); In (Dolaşım sistemine geçen hidrolizat).

Farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

K₀, A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının *in-vitro* sindirim işleminden sonra elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri incelendiğinde mide fazında ve dolaşım sistemine geçen fazda arttığı, ince bağırsak fazında en yüksek değerlere sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Kontrol örneğinin (K₀), mide sindirimi sonucu oluşan K-PG hidrolizatın hidroliz derecesi (%9,70) bağırsak sindirimi sonucu oluşan K-Out hidrolizatın hidroliz derecesinden (%15,45) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ince bağırsaktan kan dolaşım sistemine geçen K-In hidrolizatının hidroliz derecesi %13,57 olarak bulunmuştur. A₀ hidrolizatının hidroliz derecesi %9,18 iken; mide fazında (A-PG) %12,31'e yükseldiği, bağırsak fazında (A-Out) %17,61 ile en yüksek değere sahip olduğu, dolaşım fazında (A-In) da %13,68 olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde P₀ hidrolizatının bağırsak fazındaki hidroliz derecesi, mide ve dolaşım fazından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. P₀ hidrolizatının hidroliz

derecesi %7.81 iken; P-PG, P-In ve P-Out hidrolizatlarında sırasıyla %10,96, %15,58 ve %13,14 olarak bulunmuştur. F0, F-PG, F-In ve F-Out hidrolizatlarının hidroliz dereceleri sırasıyla %5,97, %10,10, %14,30 ve %12,73 olarak bulunmuştur.

Protein hidrolizi sırasında farklı bölgelere etki eden enzimlerin ardışık kullanılması, sinerji oluşturduğu için hidroliz derecesinin artmasına neden olabilir. Kula vd., (2020) tarafından yapılan çalışmada, *Trachinus draco* proteini tripsin ve alkalaz enzimleri ayrı ayrı hidroliz edildiğinde, hidroliz derecesi yaklaşık %44 olarak bulunmuştur. Ancak, 2 saat tripsin ardından 2 saat alkalaz ile hidroliz ardışık olacak şekilde hidroliz edildiğinde ise hidroliz derecesi yaklaşık %78 kadar artmıştır. Tez çalışmasında da, enzimatik hidrolizden sonra *in-vitro* sindirim işlemi uygulandığında örneklerin hidroliz derecesinin artma nedeni enzimlerin sinerjik etkisinden kaynaklandığı söylenebilir. Genel olarak hidroliz derecesi, *in-vitro* sindirim işlemine tabi tutulmayan örnekler (K_0 , A_0 , P_0 ve F_0) göre; mide sindirim aşamalarında (PG) arttığı ve ince bağırsak sindirim aşamalarında (Out) en yüksek değere ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, bağırsaktan dolaşım sistemine geçen aşamalarda (In) ise, ince bağırsak sindirim aşamalarına göre azaldığı gözlenmiştir.

4.2. *S. platensis* Protein Hidrolizatlarının ACE İnhibisyon Değerleri

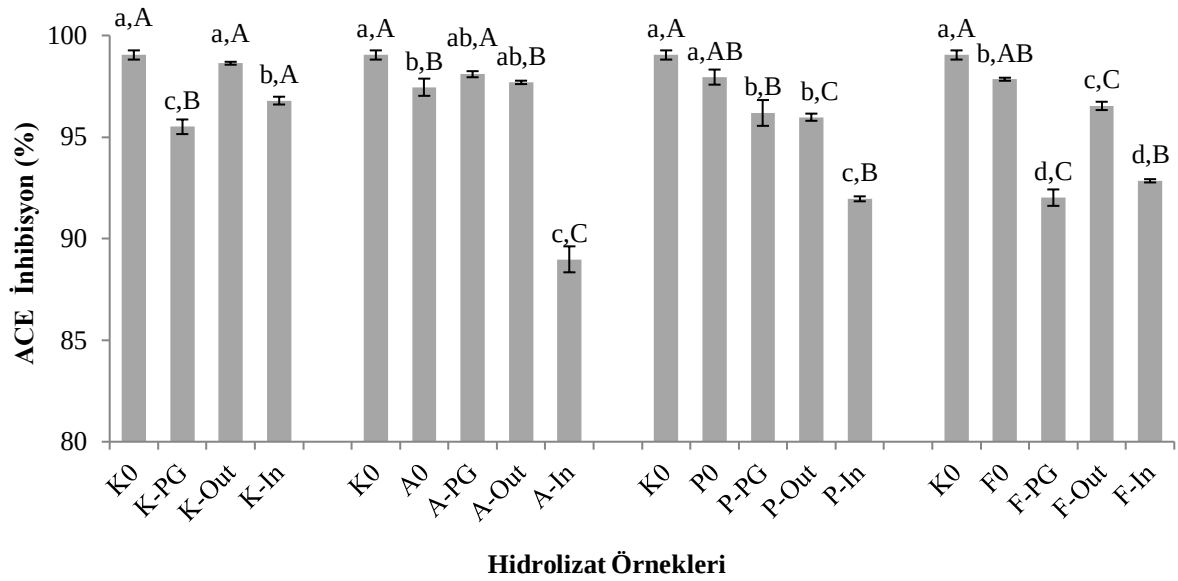
Spirulina platensis'in enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon etkisi incelenmiştir. Aşağıdaki eşitlik (4.1) kullanılarak %ACE inhibisyon (%İNH) değerleri hesaplanmıştır.

$$\%İNH = \left(\frac{E_{Kontrol} - E_{Örnek}}{E_{Kontrol}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

$E_{Örnek}$: İnhibitör örneklerin HA konsantrasyon değeri

$E_{Kontrol}$: Kontrol örneklerinin HA konsantrasyon değeri

S. platensis protein hidrolizatlarının %İNH değerleri Şekil 4.2'da gösterilmiştir. Hidroliz olmamış K_0 örneğinin ve alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile elde edilen A_0 , P_0 ve F_0 hidrolizatlarının %İNH değerleri sırasıyla %99,04, %97,45, 97,95 ve %97,84 olarak bulunmuştur. Mide sindirim fazında elde edilen K-PG, A-PG, P-PG ve F-PG hidrolizatlarının %İNH değerleri sırasıyla %95,50, %98,09, %96,19 ve %92,02; ince bağırsak sindirim fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının %İNH değerleri sırasıyla %98,63, %97,69, %95,98 ve %96,53; ince bağırsaktan kan dolaşım sistemine geçen K-In, A-In, P-In ve F-In hidrolizatlarının %İNH değerleri sırasıyla %96,79, %88,98, %91,96 ve %92,84 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *S. platensis* protein hidrolizatları ACE'yi yüksek oranda inhibe ettiği, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen örneklerde %İNH değerlerinin ortalama %95'in üzerinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *S. platensis* protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon (%) değerleri.

Farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

ACE inhibitör özelliği, genellikle ACE aktivitesinin %50 inhibisyonuna eşdeğer olan protein konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edilir. Bu nedenle elde edilen *S. platensis* protein hidrolizat örnekleri farklı oranlarda 200 kata kadar seyreltilmiş ve her bir örneğin IC_{50} değerleri bulunmuştur. Aşağıdaki verilen Tablo 4.1’de 1 kat ile 200 kat arasında seyreltilmiş örneklere ait %İNH ve protein içeriği değerleri verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bütün örneklerde seyreltme katsayısı arttıkça, protein içeriğine bağlı olarak örneklerde inhibitör konsantrasyonu azaldığı ve bunun sonucunda da %İNH değerinin azaldığı gözlenmiştir. Tablo 4.1’deki değerler kullanılarak hidrolizat örneklerinin protein içeriği ile %İNH değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 4.3’te verilmiştir.

Örneklerin seyreltilmesi ile *S. platensis* proteinin enzimatik hidroliz sonrası ACE inhibitör özelliğini arttırdığı gözlenmiştir. Özellikle alkalaz ve papain hidrolizatlarının 25 kat seyreltilmesine rağmen %İNH değerleri %72’nin üzerinde olduğu, ancak kontrol örneğinin 25 kat seyreltilme ile %İNH değeri %50’nin altına düşmüştür. Alkalaz hidrolizi sonucunda elde edilen A₀ örneği 10 kat seyreltilerek %İNH değeri %97,45’ten %93,70’e düşmüştür. Papain hidrolizi sonucunda elde edilen P₀ örneği 10 kat seyreltilerek %İNH değeri %97,94’ten %89,32’ye düşmüştür. Fakat flavourzyme hidrolizi sonucunda elde edilen F₀ örneği 10 kat seyreltme ile %İNH değeri %97,84’ten %65,40’a kadar düşmüştür. Böylece alkalaz ve papain enzimleri ile hidroliz, *S. platensis* proteinin ACE inhibitör aktivitesini flavourzyme enzimi ile hidrolizden daha fazla arttırdığı söylenebilir.

Çeşitli enzimler farklı kesme özellikleri nedeniyle tek veya çoklu fonksiyonel aktivitelerden sorumlu olan farklı yapısal özelliklere sahip peptitler üretir. Tez çalışmasında da kullanılan alkalaz ve

papain flavourzyme enzimlerinin etki mekanizmaları farklı olduğu için ACE inhibitör özelliğine sahip farklı peptitler açığa çıkmıştır. Alkalaz ve papain hidrolizatlarının flavourzyme hidrolizatından daha yüksek ACE inhibitör aktivitesini göstermesinin nedeni flavourzyme enziminin endo ve ekzopeptidaz özelliğinde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü flavourzyme protein ve peptit içindeki bağları her iki uçtan kestiği için ACE inhibitör özelliği gösteren peptitleri de parçalayabilir.

Protein içeriği 31,28 mg/ml olan seyreltilmemiş K_0 örneği ACE'yi %99,03 oranında inhibe etmektedir. K_0 örneğinin 5 kat seyreltilmesi sonucunda %İNH değeri %87,54'e düşerken, 25 kat seyreltme ile bu değer %47,79'a düşmüştür. 200 kat seyreltme sonucu ise %İNH değeri %10,49'a kadar düşmüştür. Alkalaz hidrolizi sonucunda elde edilen A_0 örneği seyreltilmemiş halde 31,04 mg/ml protein içeriğiyle ACE'yi %97,45 oranında inhibe etmektedir. A_0 örneği ACE'yi 10 kat seyreltme ile %93,70 oranında, 100 kat seyreltme ile %33,88 oranında, 200 kat seyreltme ile %25,48 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Papain hidrolizi sonucunda elde edilen ve seyreltilmemiş P_0 örneğinin protein içeriği ve %İNH değerleri sırasıyla 31,52 mg/ml ve %94,81 olarak bulunmuştur. 10 kat seyreltilmiş P_0 örneğinde %İNH değeri %89,32 iken, 50 kat seyreltmeyle %53,41'e, 200 kat seyreltmeyle kadar %10,09'a düşmüştür. Flavourzyme hidrolizi sonucunda elde edilen ve 32,44 mg/ml protein içeren seyreltilmemiş F_0 örneğinin 10 kat seyreltme ile %İNH değeri %97,84'ten %65,40'a düşmüştür. 50 kat seyreltilmiş F_0 örneğinde %İNH değeri %43,84'e, 100 kat seyreltme ile %21,03'e, 200 kat seyreltme ile %5,15'e düşmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Seyreltilmiş *S. platensis* protein hidrolizatlarının % ACE İnhibisyon ve protein içeriği değerleri.

Seyreltme oranı	Kontrol Örneği (K ₀)		Kontrol-PG Hidrolizatı (K-PG)		Kontrol-Out Hidrolizatı (K-Out)		Kontrol-In Hidrolizatı (K-In)	
	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)
1 kat	99,03 ± 0,22 ^a	31,28 ± 0,71	95,50 ± 0,35 ^a	7,91 ± 0,13	98,63 ± 0,07 ^a	6,18 ± 0,25	96,79 ± 0,19 ^a	4,65 ± 0,07
2 kat	98,47 ± 0,11 ^a	15,64	96,43 ± 0,23 ^a	3,96	97,11 ± 0,21 ^a	3,09	91,41 ± 0,38 ^b	2,33
5 kat	87,54 ± 0,39 ^b	6,26	95,84 ± 0,47 ^a	1,58	91,64 ± 0,78 ^b	1,24	65,76 ± 0,76 ^c	0,93
10 kat	67,98 ± 1,52 ^c	3,13	93,80 ± 0,59 ^a	0,79	81,10 ± 0,50 ^c	0,62	45,27 ± 0,52 ^d	0,47
25 kat	47,79 ± 1,07 ^d	1,25	81,34 ± 1,43 ^b	0,32	71,52 ± 2,14 ^d	0,25	25,82 ± 1,33 ^e	0,19
50 kat	29,16 ± 0,79 ^e	0,63	70,22 ± 0,71 ^c	0,16	60,38 ± 1,57 ^e	0,12	18,84 ± 0,98 ^f	0,09
75 kat	30,20 ± 0,90 ^e	0,42	49,27 ± 1,19 ^d	0,11	57,09 ± 1,36 ^e	0,08		
100 kat	22,99 ± 0,67 ^f	0,31	43,68 ± 1,67 ^e	0,08	48,07 ± 1,50 ^f	0,06		
150 kat	15,86 ± 1,24 ^g	0,21	33,41 ± 1,31 ^f	0,05	31,52 ± 0,81 ^g	0,04		
200 kat	10,49 ± 1,01 ^h	0,16	18,53 ± 0,65 ^g	0,04	16,66 ± 1,04 ^h	0,03		

Seyreltme oranı	Alkalaz Hidrolizatı (A ₀)		Alkalaz-PG Hidrolizatı (A-PG)		Alkalaz-Out Hidrolizatı (A-Out)		Alkalaz-In Hidrolizatı (A-In)	
	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)
1 kat	97,45 ± 0,42 ^a	31,04 ± 0,48	98,09 ± 0,14 ^a	7,67 ± 0,14	97,68 ± 0,08 ^a	5,74 ± 0,11	88,97 ± 0,63 ^a	4,8 ± 0,11
2 kat	98,65 ± 0,21 ^a	15,52	88,98 ± 0,44 ^b	3,84	97,27 ± 0,33 ^a	2,87	72,22 ± 0,70 ^b	2,40
5 kat	96,17 ± 0,31 ^{ab}	6,21	77,33 ± 0,29 ^c	1,53	75,65 ± 1,08 ^b	1,15	55,51 ± 0,57 ^c	0,96
10 kat	93,70 ± 0,63 ^b	3,10	70,33 ± 0,89 ^d	0,77	65,22 ± 1,25 ^c	0,57	48,52 ± 0,46 ^d	0,48
25 kat	72,26 ± 0,84 ^c	1,24	56,74 ± 1,07 ^e	0,31	49,58 ± 0,58 ^d	0,23	31,48 ± 0,40 ^e	0,19
50 kat	54,87 ± 1,69 ^d	0,62	36,40 ± 0,21 ^f	0,15	15,64 ± 0,99 ^e	0,11	13,50 ± 0,87 ^f	0,10
75 kat	39,43 ± 1,90 ^e	0,41	27,41 ± 0,43 ^g	0,10				
100 kat	33,88 ± 1,27 ^f	0,31	20,63 ± 0,75 ^h	0,08				
150 kat	29,23 ± 1,27 ^{fg}	0,21	5,55 ± 1,72 ⁱ	0,05				
200 kat	25,48 ± 1,69 ^g	0,16						

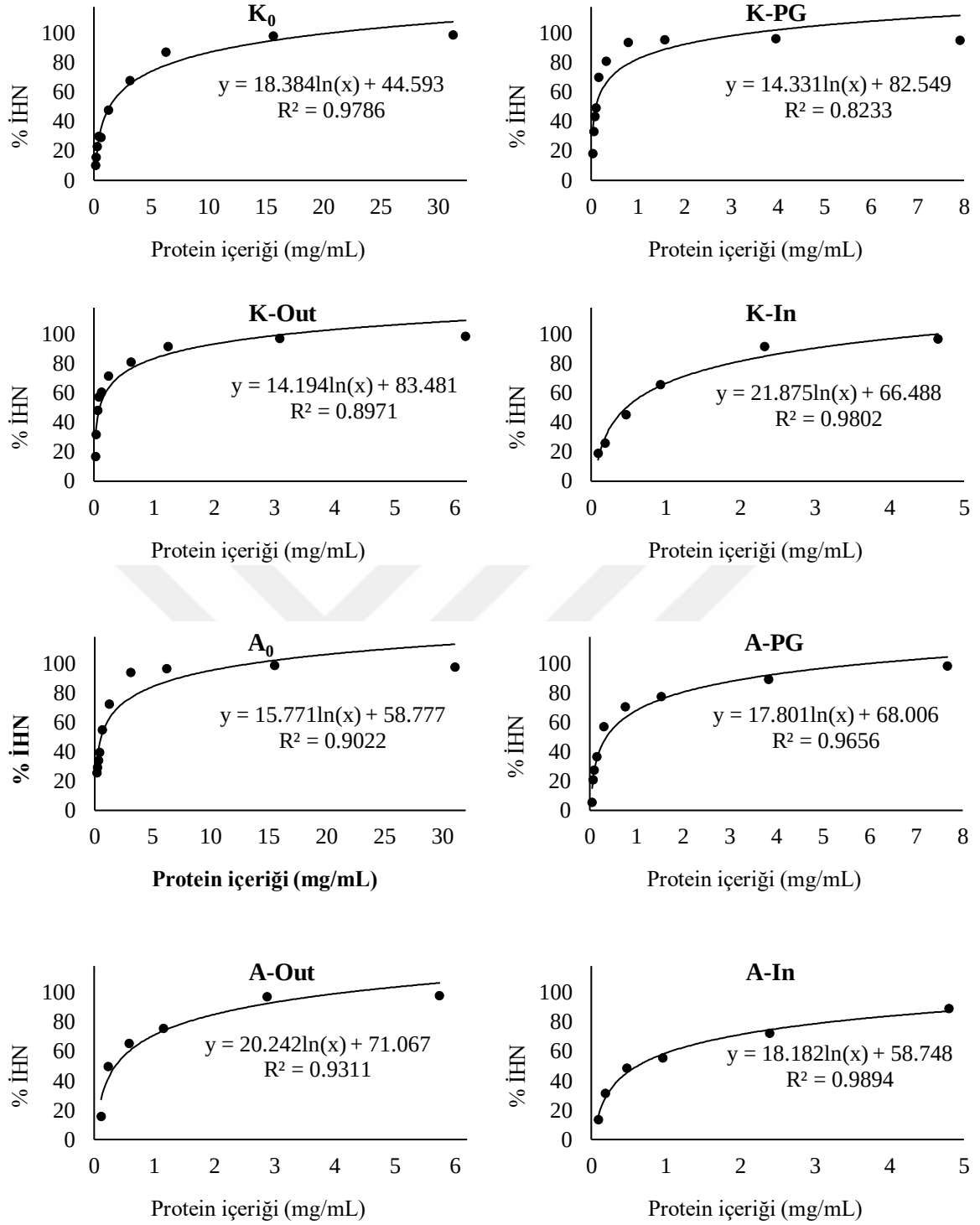
Her sütundaki farklı küçük harfler (a-i), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.1. (devam) Seyreltilmiş *S. platensis* protein hidrolizatlarının % ACE İnhibisyon ve protein içeriği değerleri.

Seyreltme oranı	Papain Hidrolizatı (P ₀)		Papain-PG Hidrolizatı (P-PG)		Papain-Out Hidrolizatı (P-Out)		Papain-In Hidrolizatı (P-In)	
	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)
1 kat	97,94 ± 0,37 ^a	31,52 ± 0,45	96,18 ± 0,63 ^a	7,59 ± 0,16	95,97 ± 0,17 ^a	5,97 ± 0,21	91,95 ± 0,12 ^a	4,8 ± 0,07
2 kat	95,79 ± 0,44 ^{ab}	15,76	91,43 ± 0,79 ^b	3,80	90,78 ± 0,46 ^b	2,99	77,99 ± 0,60 ^b	2,40
5 kat	93,21 ± 0,52 ^{bc}	6,30	72,66 ± 0,58 ^c	1,52	70,62 ± 0,58 ^c	1,19	69,40 ± 0,28 ^c	0,96
10 kat	89,32 ± 1,26 ^c	3,15	52,91 ± 0,68 ^d	0,76	57,71 ± 0,99 ^d	0,60	57,72 ± 0,52 ^d	0,48
25 kat	77,70 ± 1,33 ^d	1,26	28,90 ± 1,42 ^e	0,30	29,70 ± 0,46 ^e	0,24	37,97 ± 1,21 ^e	0,19
50 kat	53,41 ± 0,74 ^e	0,63	23,18 ± 0,84 ^f	0,15	15,10 ± 1,05 ^f	0,12	8,00 ± 1,45 ^f	0,10
75 kat	43,84 ± 1,78 ^f	0,42	16,03 ± 0,80 ^g	0,10				
100 kat	22,08 ± 0,89 ^g	0,32	9,93 ± 1,13 ^h	0,08				
150 kat	17,87 ± 1,18 ^g	0,21						
200 kat	10,09 ± 1,63 ^h	0,16						

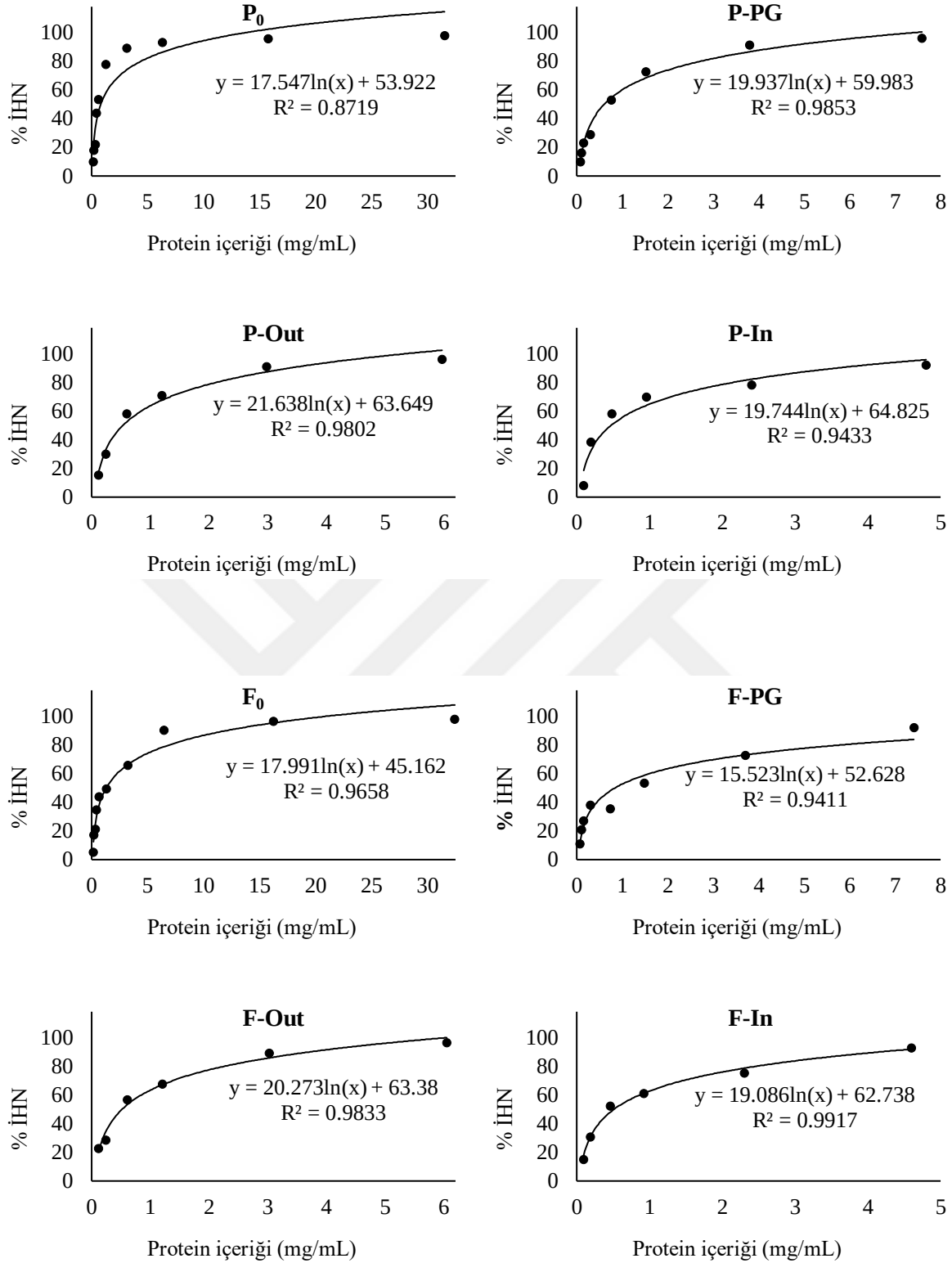
Seyreltme oranı	Flavourzyme Hidrolizatı (F ₀)		Flavourzim-PG Hidrolizatı (F-PG)		Flavourzim-Out Hidrolizatı (F-Out)		Flavourzim-In Hidrolizatı (F-In)	
	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)	%İNH	Protein içeriği (mg/mL)
1 kat	97,84 ± 0,07 ^a	32,44 ± 0,61	92,01 ± 0,40 ^a	7,41 ± 0,06	96,53 ± 0,20 ^a	6,05 ± 0,07	92,84 ± 0,08 ^a	4,6 ± 0,07
2 kat	96,31 ± 0,29 ^a	16,22	72,51 ± 0,53 ^b	3,71	89,19 ± 0,45 ^b	3,03	75,41 ± 0,60 ^b	2,30
5 kat	90,01 ± 0,44 ^b	6,49	53,21 ± 0,67 ^c	1,48	67,59 ± 0,66 ^c	1,21	60,93 ± 0,76 ^c	0,92
10 kat	65,40 ± 0,59 ^c	3,24	35,27 ± 1,21 ^d	0,74	56,68 ± 0,66 ^d	0,61	52,14 ± 0,24 ^d	0,46
25 kat	49,21 ± 0,74 ^d	1,30	37,65 ± 1,16 ^d	0,30	28,50 ± 1,58 ^e	0,24	30,74 ± 0,75 ^e	0,18
50 kat	43,84 ± 0,89 ^e	0,65	26,92 ± 1,34 ^e	0,15	22,79 ± 0,56 ^f	0,12	15,10 ± 0,92 ^f	0,09
75 kat	34,59 ± 1,18 ^f	0,43	20,67 ± 0,91 ^f	0,10				
100 kat	21,03 ± 0,59 ^g	0,32	10,77 ± 0,80 ^g	0,07				
150 kat	17,03 ± 1,33 ^h	0,22						
200 kat	5,15 ± 1,48 ⁱ	0,16						

Her sütundaki farklı küçük harfler (a-i), istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.3. *S. platensis* protein hidrolizatlarının protein içeriği ile %İHN değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler.

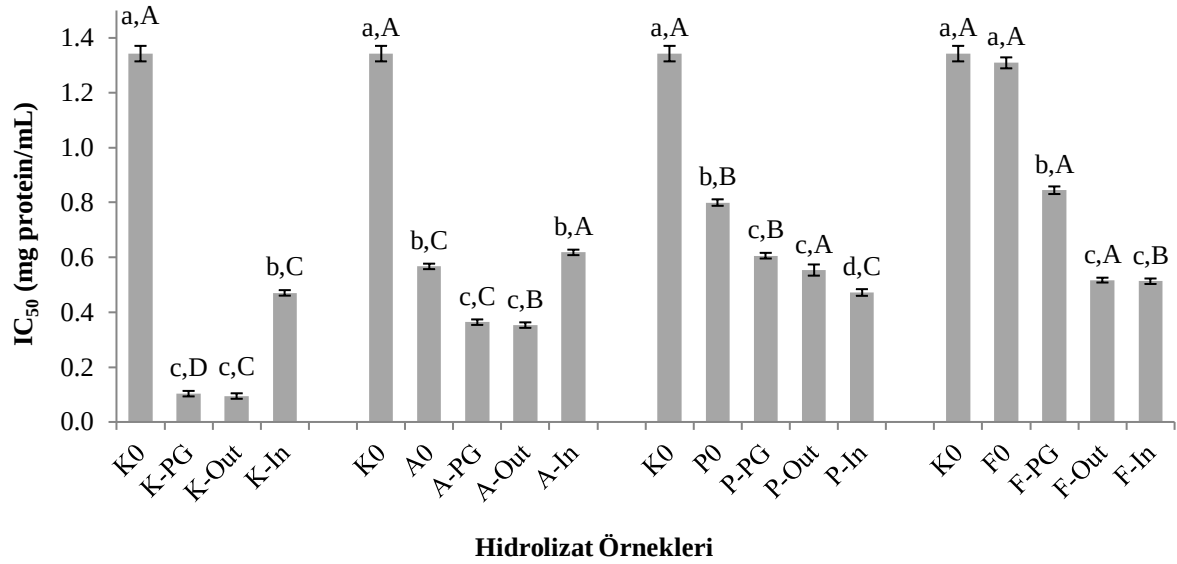
K₀ (Kontrol örneği); A₀ (Alkalaz hidrolizatı); P₀ (Papain hidrolizatı); F₀ (Flavourzyme hidrolizatı); PG (Mide hidrolizatı); Out (İnce bağırsak hidrolizatı); In (Dolaşım sistemine geçen hidrolizat).



Şekil 4.3. (devamı) *S. platensis* protein hidrolizatlarının protein içeriği ile %İHN değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler.

K₀ (Kontrol örneği); A₀ (Alkalaz hidrolizatı); P₀ (Papain hidrolizatı); F₀ (Flavourzyme hidrolizatı); PG (Mide hidrolizatı); Out (İnce bağırsak hidrolizatı); In (Dolaşım sistemine geçen hidrolizat).

Elde edilen bütün grafiklerde, protein içeriği ile %İNH değerleri arasındaki ilişki logaritmik olarak değiştiği gözlenmiştir. Bu nedenle her örneğin IC₅₀ değerini hesaplamak için grafiklerin logaritmik denklemleri kullanılmıştır. Hidroliz öncesi, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemleri sonrası elde edilen *S. platensis* protein hidrolizatlarının hesaplama sonucu IC₅₀ değerleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. *S. platensis* protein hidrolizatlarının IC₅₀ değerleri.

Farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Şekil 4.4 incelendiğinde hidroliz olmamış *S. platensis* proteinleri (K₀) diğer tüm örneklerle karşılaştırıldığında en yüksek IC₅₀ değerine (1,34 mg protein/ml) sahip olduğu gözlenmiştir. *S. platensis* proteinlerinin alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidrolizi sonrası elde edilen hidrolizatlar arasında A₀ örneği en düşük IC₅₀ değerine sahip olup, K₀ örneğine göre IC₅₀ değeri yaklaşık %57 azalarak 0,57 mg protein/ml olarak bulunmuştur. *In-vitro* sindirim işlemi sırasında mide ve ince bağırsak sindirim fazlarında elde edilen K-PG ve K-Out örnekleri tüm örnekler arasında en düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. K-PG ve K-Out örnekleri K₀ örneğine göre düşük IC₅₀ değerleri yaklaşık %93 azalarak sırasıyla 0,09 mg protein/ml ve 0,10 mg protein/ml olarak bulunmuştur.

Hidroliz süresince elde edilen örneklerin hidroliz olmamış kontrol örneğine göre IC₅₀ değerlerindeki azalma, ACE inhibisyon etkilerinin arttığı anlamına gelmektedir. Buna göre K₀ örneği en düşük, K-PG ve K-Out örnekleri en yüksek ACE inhibisyon etkiye sahip olduğu söylenebilir. Hidroliz işlemi; proteinlerin antihipertansif, antioksidan, antimikrobiyal, kolesterol düşürme gibi biyoaktif özelliklerini arttırdığı ve bunun hidroliz sonrası açığa çıkan biyoaktif peptitlerden

kaynaklandığı bilinmektedir (Lordan vd., 2011; Ünal vd., 2018). Bu nedenle hem enzimlerle hem de *in-vitro* sindirim ile gerçekleşen hidroliz işlemleri, biyoaktif peptitlerin de açığa çıkması sonucu *S.platensis* proteinlerinin ACE inhibisyon etkilerini arttırdığı söylenebilir. Böylece en yüksek ACE inhibisyon etkiye sahip K-PG ve K-Out örnekleri, hidroliz olmamış K₀ örneğinden sırasıyla 13,02 ve 14,21 kat daha fazla inhibisyon etkisi gösteriyor denilebilir.

Otero ve Verdasco-Martín (2023); alkalaz, flavourzyme, ultraflo ve vinoflow enzimlerini kullanarak *Spirulina*'dan elde ettikleri hidrolizatların ACE inhibitör aktivitelerini araştırmışlardır. Alkalaz ekstraktının en düşük IC₅₀ değerine, dolayısıyla en yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğunu ve kontrol örneğinin 3,8 katı kadar inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada kontrol örneği, alkalaz, flavourzyme, ultraflo ve vinoflow hidrolizatlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,189, 0,050, 0,236, 0,178 ve 0,404 mg/ml olarak bulunmuştur.

Heo vd., (2017) *Spirulina* proteinini simüle edilmiş fizyolojik koşullar altında gastrointestinal enzimler kullanarak hidroliz ettikten sonra kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış ACE inhibitör peptit elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada gastrointestinal hidrolizatın IC₅₀ değeri 0,98 mg/ml iken Thr-Met-Glu-Pro-Gly-Lys-Pro amino asit dizilimine sahip saflaştırılmış ACE inhibitör peptidin IC₅₀ değeri 0,10 mg/ml olarak bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada pepsin, papain, fisin ve alkalaz kullanılarak *S. platensis* proteininden farklı hidroliz sürelerinde elde edilen enzimatik hidrolizatların ACE inhibitör aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada papain ile 360 dk ve alkalaz ile 270 dk hidroliz sonrası elde elden hidrolizatlar, ACE'yi yaklaşık %100 oranında inhibe ederek en yüksek inhibitör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. En yüksek aktiviteye sahip papain ve alkalaz hidrolizatların IC₅₀ değeri sırasıyla 0,56 ve 0,49 mg/ml olarak bulunmuştur (Villaro vd., 2023).

Arslan vd., (2021) tarafından yapılan çalışmada *Spirulina* tozu ve *Spirulina*'dan saflaştırılmış fikosiyanin tozunun ACE inhibisyon aktivitesinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 2,93 ve 3,96 mg protein/ml olarak bulunmuştur. He ve., (2007) yaptıkları çalışmada *S. platensis*'ten Protamex ve SM98011 enzimleri tarafından parçalanarak elde edilen hidrolizatların IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,17 ve 0,22 mg/ml olarak bulmuşlardır.

Li-chuang vd., (2009), *Spirulina*'dan elde ettikleri fikobiliproteinleri, pepsin ve tripsin enzimlerini kullanarak hidroliz edip elde ettikleri hidrolizatların spektrofotometrik yöntemle ACE inhibisyon aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmada pepsin ve tripsin hidrolizatlarının IC₅₀ değerini sırasıyla 0,104 ve 0,087 mg/ml olarak bulmuşlardır. Mallikarjun Gouda vd., (2014), Süperkritik CO₂ (SCCO₂) ile *Spirulina*'dan elde ettikleri ekstraktın IC₅₀ değerini incelemişlerdir. SCCO₂ ile elde ettikleri ekstraktın IC₅₀ değerini 0,27 mg/ml olarak bulmuşlardır.

S. platensis kullanılarak ACE inhibisyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun protein ekstraksiyon prosedürü, hidroliz için seçilen enzimler, hidroliz sürecinin parametreleri (substrat/enzim oranı, pH, süre, sıcaklık) gibi çeşitli farklı nedenler veya ACE inhibitör

aktivitesinin belirlenmesi için farklı analitik yöntemlerin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Boschin vd., 2014).

4.3. *Spirulina platensis* Protein Hidrolizatlarının Antioksidan Aktivite Değerleri

S. spirulina platensis'ten enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemler sonrası elde edilen protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri; demir (III) iyonu (ferrik) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme kapasitesi ve ABTS radikali süpürme kapasitesi yöntemlerine göre belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'te gösterilmiştir.

Tablo 4.2'de gösterildiği gibi *Spirulina* protein hidrolizatlarının FRAP yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri 0,82 ile 31,87 mg TE/g KM arasında değişmiştir. FRAP yöntemine göre K₀ örneğinin antioksidan aktivite değeri (7,21 mg TE/g KM) *in-vitro* sindirim sonrası artış göstermiş ve en yüksek değer ince bağırsak fazında elde edilen K-Out örneğinde (31,87 mg TE/g KM) bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer durum enzimatik hidroliz sonrası yapılan *in-vitro* sindirimin ince bağırsak fazında elde edilen hidrolizatlarda da görülmektedir. Kontrol ve enzimatik hidrolizatların tüm örneklerinde *in-vitro* sindirimin ikinci aşaması olan ince bağırsak fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatları, başlangıç örneğine (K₀) kıyasla FRAP antioksidan aktivite değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). İnce bağırsak fazında elde edilen A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının FRAP yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri sırasıyla 20,16, 21,73 ve 23,33 mg TE/g KM olarak bulunmuştur. Alkalaz hidrolizi sonrası elde edilen A₀ hidrolizatının FRAP antioksidan aktivite değeri (7,28 mg TE/g KM) K₀ örneğine göre istatistiksel olarak değişmezken ($p > 0,05$), papain ve flavourzyme hidrolizi sonrası elde edilen P₀ ve F₀ hidrolizatlarının FRAP antioksidan aktivite değerleri daha düşük çıkmıştır ($p < 0,05$).

Spirulina protein hidrolizatlarının en düşük ve en yüksek DPPH-radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri sırasıyla P-In ve K-PG örneklerinde 0,54 ve 4,96 mg TE/g KM olarak bulunmuştur. İnce bağırsak fazında elde edilen A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının (K-Out hidrolizatı hariç) DPPH-radikal süpürme aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p > 0,05$), başlangıç örneği olan K₀'a göre daha yüksek aktivite göstermişlerdir ($p < 0,05$). A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının DPPH-radikal süpürme aktivitesi sırasıyla 2,37, 2,66 ve 2,54 mg TE/g KM olarak bulunmuştur.

Spirulina protein hidrolizatlarının ABTS-radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri 16,42 ile 678,61 mg TE/g KM arasında değişmiştir. *Spirulina* protein hidrolizatlarının ABTS-radikal süpürme aktivitelerindeki değişim FRAP yöntemine göre benzerlik göstermektedir. Hidroliz olmamış K₀ örneği ve A₀, P₀, F₀ hidrolizatlarının *in-vitro* sindirim yöntemiyle hidroliz olduktan sonra mide fazında ABTS-radikal süpürme antioksidan aktiviteleri anlamlı bir artış göstermiş ve en yüksek aktivite ince bağırsak fazında elde edilen örneklerde bulunmuştur ($p < 0,05$). K₀ örneğinin ABTS-

radikal süpürme aktivitesi 36,39 mg TE/g KM iken, ince bağırsak fazında elde edilen K-Out A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının ABTS-radikal süpürme aktiviteleri sırasıyla 518,80, 674,66, 589,63 ve 602,71 mg TE/g KM olarak bulunmuştur. Enzimatik hidrolizat sonrası ABTS-radikal süpürme aktivitesi incelendiğinde alkalaz hidrolizatında (A₀; 67,60 mg TE/g KM), K₀ örneğine göre anlamlı bir artış görülürken, papain (P₀; 30,85 mg TE/g KM) ve flavourzyme (F₀; 16,42 mg TE/g KM) hidrolizatlarında bir düşüş görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 4.2. *Spirulina platensis* protein hidrolizatlarının antioksidan aktivite değerleri

Hidrolizat	FRAP mg TE/g KM	DPPH mg TE/g KM	ABTS mg TE/g KM
K ₀	7,21 ± 0,20 ^{c,A}	1,99 ± 0,01 ^{b,A}	36,39 ± 0,78 ^{b,B}
K-PG	16,57 ± 2,60 ^{b,A}	4,96 ± 0,22 ^{a,A}	53,85 ± 0,71 ^{b,B}
K-Out	31,87 ± 0,44 ^{a,A}	0,71 ± 0,19 ^{c,B}	518,80 ± 16,06 ^{a,C}
K-In	5,20 ± 0,38 ^{c,A}	1,32 ± 0,12 ^{c,A}	504,01 ± 23,67 ^{a,B}
K ₀	7,21 ± 0,20 ^{b,A}	1,99 ± 0,01 ^{b,A}	36,39 ± 0,78 ^{b,B}
A ₀	7,28 ± 0,22 ^{b,A}	1,89 ± 0,01 ^{b,AB}	67,60 ± 0,06 ^{b,A}
A-PG	8,04 ± 0,14 ^{b,B}	0,57 ± 0,05 ^{c,C}	69,54 ± 1,40 ^{b,A}
A-Out	20,16 ± 0,07 ^{a,C}	2,37 ± 0,14 ^{a,A}	674,66 ± 9,09 ^{a,A}
A-In	3,24 ± 0,47 ^{c,B}	0,72 ± 0,01 ^{c,B}	678,61 ± 5,81 ^{a,A}
K ₀	7,21 ± 0,20 ^{b,A}	1,99 ± 0,01 ^{b,A}	36,39 ± 0,78 ^{c,B}
P ₀	3,20 ± 0,09 ^{d,C}	0,74 ± 0,05 ^{cd,C}	30,85 ± 2,38 ^{c,C}
P-PG	5,09 ± 0,33 ^{c,B}	0,85 ± 0,01 ^{c,C}	40,86 ± 0,76 ^{c,C}
P-Out	21,73 ± 0,28 ^{a,BC}	2,66 ± 0,03 ^{a,A}	589,63 ± 21,34 ^{a,B}
P-In	1,74 ± 0,13 ^{e,C}	0,54 ± 0,05 ^{d,B}	425,04 ± 14,26 ^{b,B}
K ₀	7,21 ± 0,20 ^{b,A}	1,99 ± 0,01 ^{b,A}	36,39 ± 0,78 ^{c,B}
F ₀	5,30 ± 0,19 ^{c,B}	1,74 ± 0,08 ^{bc,B}	16,42 ± 1,08 ^{c,D}
F-PG	4,38 ± 0,18 ^{c,B}	1,54 ± 0,03 ^{c,B}	59,14 ± 2,06 ^{c,B}
F-Out	23,33 ± 0,65 ^{a,B}	2,54 ± 0,14 ^{a,A}	602,71 ± 12,15 ^{a,B}
F-In	0,82 ± 0,11 ^{d,C}	0,70 ± 0,04 ^{d,B}	334,64 ± 32,23 ^{b,C}

FRAP (ferrik indirgeme-antioksidan gücü); DPPH (DPPH-radikal süpürme aktivitesi); ABTS (ABTS-radikal süpürme aktivitesi).

Her sütundaki farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Her sütundaki farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Mide fazında elde edilen örneklerin ABTS-radikal süpürme aktiviteleri K₀ örneğine göre ortalama 1,53 kat artarken, ince bağırsak fazında elde edilen örneklerin ABTS-radikal süpürme aktiviteleri ortalama 16,39 kat artmıştır. *Spirulina* protein hidrolizatlarının DPPH ve ABTS radikal süpürme antioksidan aktiviteleri incelendiğinde FRAP yöntemine göre benzerlik göstermektedir. ABTS yöntemine göre K₀ örneğinin radikal süpürme aktivitesi *in-vitro* sindirim sonrası artmış ve en yüksek değerler ince bağırsak fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarda bulunmuştur.

Protein hidrolizi sonucu elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan kapasitesi; peptit molekül ağırlığı, amino asit kompozisyonu ve reaktif oksijen türleri/serbest radikal tipi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Ejike vd., 2017). Bu nedenle, tez çalışmasında farklı enzimler ve *in-vitro* sindirim kullanarak

elde edilen hidrolizatların antioksidan aktivite değerlerinin farklı olması, hidrolizatların içerdiği peptitlerin farklı yapılara sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.4. *Spirulina platensis* Protein Hidrolizatlarının Fenolik Bileşen İçerikleri ve Toplam Fenolik Madde Miktarları

Spirulina platensis protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri gallik asit, kateşin, klorojenik asit, şiranjik asit, kumarik asit, mirisetin, kuersetin ve izoramnetin fenolik standartları kullanılarak HPLC-DAD (Shimadzu-20 AD, Japonya)'de incelenmiştir. Ayrıca *S. platensis* protein hidrolizatlarının, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. *Spirulina* protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri ve toplam fenolik madde miktarları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3'te gösterildiği gibi *Spirulina* protein hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı 8,16 ile 24,23 mg GAE/g KM arasında değişmiştir. K₀ örneğinin toplam fenolik madde miktarı (11,20 mg GAE/g KM) *in-vitro* sindirim sonrası mide fazında artış göstermiş (K-PG; 17,57 mg GAE/g KM) ve en yüksek değer ince bağırsak fazında elde edilen K-Out örneğinde (24,23 mg GAE/g KM) bulunmuştur. Benzer durum enzimatik hidroliz sonrası yapılan *in-vitro* sindirimin ince bağırsak fazında elde edilen hidrolizatlarda da görülmektedir. İnce bağırsak fazında elde edilen A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 19,34, 20,69 ve 21,47 mg GAE/g KM olarak bulunmuştur. Kontrol ve enzimatik hidrolizatların tüm örneklerinde *in-vitro* sindirimin ikinci aşaması olan ince bağırsak fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatları, başlangıç örneğine (K₀) kıyasla toplam fenolik madde miktarlarında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz sonrası elde edilen A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının K₀ örneğine göre toplam fenolik madde miktarında artış olduğu gözlenmiştir. A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 22,01, 12,41 ve 14,75 mg GAE/g KM olarak bulunmuştur. K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinin toplam fenolik madde miktarları istatistiksel olarak incelendiğinde, değerler arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Spirulina protein hidrolizatlarının gallik asit içeriği 3,76 ile 481,40 ppm arasında değiştiği gözlenmiştir. K₀ örneğinin gallik asit içeriği (31,46 ppm) *in-vitro* sindirim sonrası artış göstermiş ve en yüksek değer mide fazında elde edilen K-PG örneğinde (481,40 ppm) bulunmuştur ($p < 0,05$). Enzimatik hidroliz sonrası elde edilen A₀ ve F₀ hidrolizatlarının, başlangıç örneğine (K₀) göre gallik asit içeriğinde anlamlı bir artış görülürken, P₀ hidrolizatında azalma meydana gelmiştir ($p < 0,05$). A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının gallik asit içerikleri sırasıyla 49,76, 11,57 ve 66,73 ppm olarak bulunmuştur.

Spirulina protein hidrolizatlarının en düşük ve en yüksek kateşin içeriği değerleri sırasıyla P-PG ve K-Out örneklerinde 47,28 ve 1293,34 ppm olarak bulunmuştur. K₀ örneğinin kateşin içeriği (112,69 ppm) *in-vitro* sindirim sonrası mide fazında arttığı (K-PG; 1292,28 ppm), ince bağırsak

fazında sabit kaldığı (K-Out; 1293,34 ppm) ve bağırsak kan dolaşım fazına yaklaşık olarak yarısı (K-In; 650,62 ppm) geçtiği gözlenmiştir.

Spirulina protein hidrolizatlarının klorojenik asit içerikleri incelendiğinde; K₀ örneğinin 3,99 ppm iken, ince bağırsak fazında en yüksek değer (K-Out; 45,86 ppm) olduğu gözlenmiştir. Mide fazında elde edilen K-PG, P-PG ve F-PG hidrolizatlarının klorojenik asit içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). K-PG, P-PG ve F-PG hidrolizatlarının klorojenik asit içerikleri sırasıyla 16,00, 16,00 ve 17,12 ppm olarak bulunmuştur. Klorojenik asit, K-In, P-In ve F-In örneklerinde tanımlanmadığı için kan dolaşım sistemine geçemediği söylenebilir. Ayrıca, alkalaz hidrolizi sonrası hiçbir fraksiyonda da (A₀, A-PG, A-Out ve A-In) tanımlanmamıştır.

Spirulina protein hidrolizatlarının şirinjik asit içeriği, 1,08 ila 57,86 ppm arasında değiştiği gözlenmiştir. K₀, P₀ ve F₀ örneklerinin şirinjik asit içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), alkalaz enzimi ile elde edilen A₀ örneği en yüksek içeriğe sahip olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). K-In, A-In, P-In ve F-In örneklerinde tanımlanmayan şirinjik asit kan dolaşım sistemine geçemediği söylenebilir.

Tablo 4.3. *Spirulina platensis* protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri ve toplam fenolik madde miktarları.

Hidrolizat	Gallik asit (ppm)	Kateşin (ppm)	Klorojenik asit (ppm)	Şirinjik asit (ppm)	Kumarik asit (ppm)
K ₀	31,46 ± 1,47 ^{d,C}	112,69 ± 5,76 ^{c,B}	3,99 ± 0,28 ^{c,A}	7,91 ± 0,51 ^{a,B}	1,62 ± 0,08 ^{c,B}
K-PG	481,40 ± 21,52 ^{a,A}	1292,28 ± 62,10 ^{a,A}	16,00 ± 0,85 ^{b,A}	1,08 ± 0,07 ^{b,B}	1,72 ± 0,10 ^{c,C}
K-Out	181,79 ± 8,05 ^{b,B}	1293,34 ± 77,69 ^{a,A}	45,86 ± 3,31 ^{a,A}	6,86 ± 0,34 ^{a,A}	61,62 ± 3,73 ^{a,A}
K-In	128,18 ± 6,12 ^{c,A}	650,62 ± 36,80 ^{ba,A}	-	-	10,71 ± 0,68 ^{b,A}
K ₀	31,46 ± 1,47 ^{c,C}	112,69 ± 5,76 ^{c,B}	3,99 ± 0,28 ^{a,A}	7,91 ± 0,51 ^{c,B}	1,62 ± 0,08 ^{b,B}
A ₀	49,76 ± 2,21 ^{a,B}	264,54 ± 13,35 ^{a,A}	-	57,86 ± 3,31 ^{a,A}	17,13 ± 1,02 ^{a,A}
A-PG	45,96 ± 2,74 ^{ab,C}	184,96 ± 11,12 ^{b,B}	-	23,60 ± 1,19 ^{b,A}	2,80 ± 0,16 ^{b,B}
A-Out	39,05 ± 1,73 ^{bc,C}	173,32 ± 10,25 ^{b,B}	-	-	2,24 ± 0,13 ^{b,C}
A-In	17,78 ± 1,01 ^{d,C}	87,05 ± 4,36 ^{c,B}	-	-	3,28 ± 0,18 ^{b,B}
K ₀	31,46 ± 1,47 ^{a,C}	112,69 ± 5,76 ^{a,B}	3,99 ± 0,28 ^{b,A}	7,91 ± 0,51 ^{a,B}	1,62 ± 0,08 ^{b,B}
P ₀	11,57 ± 0,88 ^{b,D}	102,81 ± 7,13 ^{a,B}	3,93 ± 0,24 ^{b,A}	2,21 ± 0,11 ^{b,B}	-
P-PG	3,76 ± 0,20 ^{c,C}	47,28 ± 3,27 ^{b,B}	16,00 ± 0,91 ^{a,A}	-	-
P-Out	34,63 ± 2,02 ^{a,C}	120,07 ± 6,93 ^{a,B}	-	-	14,66 ± 0,91 ^{a,B}
P-In	5,20 ± 0,27 ^{c,C}	68,64 ± 3,62 ^{b,B}	-	-	-
K ₀	31,46 ± 1,47 ^{d,C}	112,69 ± 5,74 ^{a,B}	3,99 ± 0,28 ^{b,A}	7,91 ± 0,51 ^{a,B}	1,62 ± 0,08 ^{b,B}
F ₀	66,73 ± 2,64 ^{c,A}	64,85 ± 3,67 ^{c,C}	-	4,71 ± 0,27 ^{b,B}	-
F-PG	159,88 ± 6,15 ^{b,B}	85,16 ± 4,54 ^{b,BC}	17,12 ± 1,05 ^{a,A}	-	3,64 ± 0,22 ^{a,A}
F-Out	275,65 ± 15,98 ^{a,A}	69,16 ± 3,62 ^{bc,B}	-	-	-
F-In	46,59 ± 2,60 ^{cd,B}	87,00 ± 5,63 ^{b,B}	-	-	-

FBT (fenolik bileşenlerin toplam); TFM (toplam fenolik madde miktarı).

Her sütundaki farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Her sütundaki farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.3. (devamı) *Spirulina platensis* protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri ve toplam fenolik madde miktarları.

Hidrolizat	Mirisetin (ppm)	Kuarsetin (ppm)	İzoramnetin (ppm)	FBT (ppm)	TFM mg GAE/g KM
K ₀	14,90 ± 0,91 ^{b,B}	0,11 ± 0,02 ^{a,C}	9,28 ± 0,45 ^{a,B}	181,96 ± 2,81 ^{c,B}	11,20 ± 0,33 ^{c,D}
K-PG	22,04 ± 1,24 ^{a,A}	-	-	1814,52 ± 38,66 ^{a,A}	17,57 ± 0,28 ^{b,A}
K-Out	14,51 ± 0,82 ^{b,A}	-	-	1603,99 ± 63,08 ^{a,A}	24,23 ± 0,40 ^{a,A}
K-In	2,91 ± 0,17 ^{c,A}	-	-	792,43 ± 29,83 ^{b,A}	23,62 ± 1,09 ^{a,A}
K ₀	14,90 ± 0,91 ^{b,B}	0,11 ± 0,02 ^{b,C}	9,28 ± 0,45 ^{b,B}	181,96 ± 2,81 ^{d,B}	11,20 ± 0,33 ^{d,D}
A ₀	26,79 ± 1,56 ^{a,A}	2,65 ± 0,08 ^{a,A}	21,88 ± 1,30 ^{a,A}	440,61 ± 11,40 ^{a,A}	22,01 ± 0,34 ^{a,A}
A-PG	23,84 ± 1,44 ^{a,A}	-	-	281,16 ± 5,90 ^{b,B}	16,54 ± 0,27 ^{c,B}
A-Out	11,65 ± 0,71 ^{b,B}	-	-	226,25 ± 12,55 ^{c,BC}	19,34 ± 0,36 ^{b,C}
A-In	-	-	-	108,11 ± 5,19 ^{e,B}	11,90 ± 0,24 ^{d,B}
K ₀	14,90 ± 0,91 ^{a,B}	0,11 ± 0,02 ^{b,C}	9,28 ± 0,45 ^{a,B}	181,96 ± 2,81 ^{a,B}	11,20 ± 0,33 ^{b,D}
P ₀	9,98 ± 0,45 ^{b,C}	0,35 ± 0,03 ^{a,C}	3,00 ± 0,11 ^{b,C}	133,85 ± 5,81 ^{b,C}	12,41 ± 0,01 ^{b,C}
P-PG	13,32 ± 0,68 ^{a,B}	-	-	80,36 ± 1,89 ^{c,C}	12,20 ± 0,21 ^{b,C}
P-Out	8,68 ± 0,28 ^{b,C}	-	-	178,05 ± 5,53 ^{a,C}	20,69 ± 0,61 ^{a,BC}
P-In	-	-	-	73,84 ± 3,35 ^{c,B}	8,99 ± 0,02 ^{c,C}
K ₀	14,90 ± 0,91 ^{a,B}	0,11 ± 0,02 ^{b,C}	9,28 ± 0,45 ^{a,B}	181,96 ± 2,81 ^{c,B}	11,20 ± 0,33 ^{c,D}
F ₀	15,98 ± 1,02 ^{a,B}	1,13 ± 0,09 ^{a,B}	9,51 ± 0,60 ^{a,B}	162,91 ± 5,52 ^{cd,B}	14,75 ± 0,30 ^{b,B}
F-PG	14,40 ± 0,74 ^{ab,B}	-	-	280,20 ± 12,70 ^{b,B}	10,45 ± 0,14 ^{c,D}
F-Out	11,75 ± 0,57 ^{b,B}	-	-	356,56 ± 19,04 ^{a,B}	21,47 ± 0,62 ^{a,B}
F-In	1,46 ± 0,06 ^{c,B}	-	-	135,04 ± 8,17 ^{d,B}	8,16 ± 0,37 ^{d,C}

FBT (fenolik bileşenlerin toplam); TFM (toplam fenolik madde miktarı).

Her sütundaki farklı küçük harfler (a-e), aynı enzimatik hidrolizatta farklı sindirim aşamaları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Her sütundaki farklı büyük harfler (A-D), aynı sindirim aşamasında farklı enzimatik hidrolizatlar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Spirulina protein hidrolizatlarının kumarik asit içeriği; en düşük hidroliz olmamış K₀ örneğinde (1,62 ppm), en yüksek ince bağırsak fazında (K-Out; 61,62 ppm) olduğu gözlenmiştir. En düşük ve en yüksek mirisetin içeriği sırasıyla F-In (1,46 ppm) ve A₀ (26,76 ppm) örneklerinde tanımlanmıştır. Sadece K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinde tanımlanan kuarsetin ve izoramnetin *in-vitro* sindirimin hiçbir aşamasında tanımlanmamıştır. K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinin kuarsetin içerikleri sırasıyla 0,11, 2,65, 0,35 ve 1,13 ppm olarak bulunmuştur. K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinin izoramnetin içerikleri sırasıyla 9,28, 21,88, 3,00 ve 9,51 ppm olarak bulunmuştur.

Fenolik bileşikler; en çok antioksidan özellikleri ile bilinirler (Silva vd., 2017). Ayrıca; Flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler, bitkilerin antioksidan özelliklerine en önemli katkıda bulunurlar (Sinetova vd., 2024). Temel olarak, fenolikler bileşikler kimyasal yapılarında hidroksil grupları bulunan benzen halkasına sahip bileşiklerdir. Karbon iskeletlerine bağlı olarak; fenolik bileşikler, fenolik asitlere (gallik, vanilik, kafeik ve kumarik asit), flavonoidlere (antosiyenin, kuersetin ve kateşin), tanenlere (florotaninler) ve stilbenlere ayrılır. Mikroalgler fenolik bileşikler açısından zengin içeriğe sahiptir (Ampofo ve Abbey, 2022). 20 farklı siyanobakteri suşunda değişen miktarlarda gallik, klorojenik, kafeik, vanilik ve ferulik asitler ile rutin, kuersetin ve kaempferol gibi fenolik bileşenlerin olduğu bulunmuştur (Singh vd., 2017). *Spirulina*'da, toplam fenolik bileşikler, kültür koşullarına bağlı olarak 4,5–17 mg/g KM ve flavonoidler ise 1,32–5,12 mg/g KM arasında

değişmektedir. *Spirulina*'nın fenolik özütlerinde gallik, klorojenik, sinamik, benzoik asit ve pinostrobin gibi fenolik bileşikler HPLC kullanılarak tanımlanmıştır (Gentscheva vd., 2022). Başka bir çalışmada, *Spirulina*'da rutin (1,4 mg/g), naringenin (0,4 mg/g), kuersetin (0,3 mg/g), kaempferol ve kuersetin-3- β -glikozidin tanımlanmıştır (Guldas vd., 2021).

Literatürde farklı bitki kaynaklarından elde edilen proteinlerin ve bunların hidrolizatlarının fenolik profili çok az araştırılmıştır. Bitkisel protein izolatlarının elde edilmesinde kullanılan prosedürlerin, polifenollerin ekstraksiyonunu da kolaylaştırabileceği bildirilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu açığa çıkan peptitler ve fenolik bileşiklerin hidrolizatların antioksidan aktivitesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, bitki kaynaklı matrislerin antioksidan aktivitesi protein bileşenleri, fenolik bileşikler ve bunların kompleksleri ile ilişkilendirilmiştir, ancak protein hidrolizatları üzerinde yapılan az sayıda çalışmada fenolik bileşiklerin varlığı ve katkısı dikkate alınmıştır (Guimarães Drummond e Silva vd., 2017). Proteinlere bağlı fenolik bileşiklerin, gastrointestinal sindirim sırasında salınıp açığa çıktığı (Guimarães Drummond e Silva vd., 2017) gibi sindirim sırasında önemli ölçüde azaldığı veya tamamen parçalandığı bildirilmiştir (Silva vd., 2017). Bu durum tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Tez çalışmasında, hidrolizatlarda fenolik bileşen miktarı *in-vitro* sindirim işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlarda kontrol örneğine göre fenolik bileşenlerin miktarı genel olarak arttığı gözlenmiştir. Ancak, enzimatik hidroliz işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlarda (A_0 , P_0 ve F_0) arttığı, sonrasında *in-vitro* sindirim işlemi uygulandığında ise azaldığı veya tanımlanmadığı gözlenmiştir.

4.5. *Spirulina platensis* Protein Hidrolizatlarında Analiz Edilen Parametreler Arasındaki Korelasyon

Spirulina protein hidrolizatları için analiz edilen parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla Pearson Korelasyon Katsayısı (r^2) testi kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir. *Spirulina* protein hidrolizatlarının protein içeriği, hidroliz derecesi, ACE inhibisyon değeri, antioksidan aktivite değerleri (FRAP, DPPH, ABTS), toplam fenolik madde miktarı ve fenolik bileşenlerin toplamı arasındaki korelasyon, $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ anlamlılık seviyeleri ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.4'te incelendiğinde, *Spirulina* protein hidrolizatlarının IC_{50} değeri ile diğer tüm analiz parametreleri arasında negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bu da protein hidrolizatlarının IC_{50} değeri azaldıkça, ACE inhibitör aktivitesi arttığını doğrulamaktadır. Elde edilen sonuçlara göre IC_{50} ile hidroliz derecesi değeri ($r^2=-0,745$, $p < 0,01$) arasında güçlü negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Buna göre enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemler ile *Spirulina* proteininin hidroliz derecesine bağlı ACE inhibitör aktivitesi de arttığı söylenebilir. Daha önceki çalışmalarda da protein hidrolizatlarının biyoaktif özellikleri hidroliz derecesine büyük ölçüde bağlı olduğu bildirilmiştir. Hidroliz derecesi, bir protein hidrolizatındaki kopmuş peptit bağlarının oranını ifade etmektedir. Daha yüksek bir hidroliz derecesi, daha fazla miktarda peptit bağının kopmuş ve bu

nedenle peptitlerin ortalama moleküler ağırlığının daha küçük olduğu anlamına gelir (Barkia vd., 2019). Hidrolizatların ACE inhibitör aktivitesi peptidin boyutundan etkilendiği ve daha küçük peptitlerin genellikle daha güçlü ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Poddar ve Yu, 2024).

Tablo 4.4. *S. platensis* protein hidrolizatlarının analiz parametreleri arasındaki Pearson korelasyon katsayıları (r^2).

	HD	IC ₅₀	FRAP	DPPH	ABTS	TFM	FBT
HD	1	-0,745**	0,501*	-0,072	0,841**	0,413	0,119
IC ₅₀	-0,745**	1	-0,488	-0,151	-0,432	-0,452	-0,588*
FRAP	0,501*	-0,488	1	0,439	0,457	0,728**	0,560*
DPPH	-0,072	-0,151	0,439	1	-0,045	0,350	0,498*
ABTS	0,841**	-0,432	0,457	-0,045	1	0,364	0,010
TFM	0,413	-0,452	0,728**	0,350	0,364	1	0,538*
FBT	0,119	-0,588*	0,560*	0,498*	0,010	0,538*	1

* Korelasyon $p < 0,05$ seviyesinde anlamlıdır;

** Korelasyon $p < 0,01$ seviyesinde anlamlıdır.

HD (hidroliz derecesi); IC₅₀ (ACE aktivitesini %50 oranında inhibe edebilen protein konsantrasyonu); FRAP (ferrik indirgeyici antioksidan gücü); DPPH (DPPH-radikal temizleme aktivitesi); ABTS (ABTS-radikal temizleme aktivitesi); TFM (toplam fenolik madde); FBT (fenolik bileşenlerin toplamı).

Tablo 4.4'te, IC₅₀ değeri; FBT ($r^2=-0,588$, $p < 0,05$) ile negatif bir korelasyon göstermesine rağmen, FRAP ($r^2=-0,488$), DPPH ($r^2=-0,151$), ABTS ($r^2=-0,432$) ve TFM ($r^2=-0,452$) ile zayıf negatif bir korelasyon göstermiştir. Mikroalgler ve deniz yosunları üzerinde yapılan bir çalışmada, ACE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteler de gösterdiğini ileri sürülmüştür. Bunun nedeni genellikle antioksidan özelliklere sahip peptitlerin antihipertansif etkilere sinerji içinde veya bağımsız olarak katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Barkia vd., 2019). Ancak, başka bir çalışmada yaprak kurdu (*Spodoptera littoralis*) protein hidrolizatlarının hem ACE inhibitör hem de antioksidan aktivite göstermesine rağmen hidrolizatların ACE inhibitör ve antioksidan aktiviteleri arasında zayıf bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Vercruysse vd., 2009). Buna göre tez çalışmasında da *Spirulina* protein hidrolizatları, hem ACE inhibitör hem de antioksidan özellik göstermiş, ancak ACE inhibitör özelliği ile antioksidan özelliği arasında zayıf negatif bir ilişki olduğu söylenebilir. Bunun nedeni açığa çıkan peptitlerin farklı biyoaktif yapıda olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.4'te, hidroliz derecesi ile ABTS ($r^2=0,841$, $p < 0,01$) arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hidroliz derecesi ile FRAP ($r^2=0,501$, $p < 0,05$) arasında da korelasyon olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık, hidroliz derecesi ile TFM ($r^2=0,413$) arasında zayıf bir korelasyon olduğu gözlenirken, hidroliz derecesi ile DPPH ($r^2=-0,072$) ve FBT ($r^2=0,119$) arasında herhangi bir korelasyon bağlantısı gözlenmemiştir. Ayrıca, FRAP ile DPPH ($r^2=0,439$) ve ABTS ($r^2=0,457$) arasında zayıf bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Hidroliz işlemleri sonrası *Spirulina* proteinin hidroliz derecesi artarken, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan aktivitelerinin de artmasına

neden olduğu söylenebilir. Hidroliz derecesi diğer antioksidan yöntemler ile zayıf korelasyon göstermesi her antioksidan yöntemin etki mekanizmasının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu da elde edilen protein hidrolizatlarının biyoaktivitesinin büyük ölçüde hidroliz derecesine ve kullanılan proteaz türüne bağlı olduğu gerçeğini vurgulamaktadır (Alzahrani vd., 2018).

Tablo 4.4'te, FRAP ile TFM ($r^2=0,728$, $p < 0,01$) arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlenirken, FRAP'ın FBT ($r^2=0,560$, $p < 0,05$) ile de bir korelasyonu olduğu gözlenmiştir. FBT ile DPPH ($r^2=0,498$, $p < 0,05$) ve TFM ($r^2=0,538$, $p < 0,05$) arasında bir korelasyon olduğu gözlenirken, TFM ile DPPH ($r^2=0,350$) ve ABTS ($r^2=0,364$) arasında zayıf bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Ancak ABTS ile DPPH ($r^2=-0,045$) ve FBT ($r^2=0,010$) arasında herhangi bir korelasyon bağlantısı gözlenmemiştir. Fenolik bileşikler; anti-inflamatuvar, anti-aterosklerotik ve anti-proliferatif gibi çeşitli biyoaktivitelere sahip olmasının yanı sıra antioksidan özellikleri ile daha çok bilinirler (Silva vd., 2017). Böylece tez çalışmasında protein hidrolizatlarının fenolik bileşik içerikleri FRAP yöntemine göre antioksidan aktivitenin artmasına neden olduğu söylenebilir.

4.6. *Spirulina platensis* Protein Hidrolizatlarının LCMS IT-TOF ile Peptitlerin Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

S. platensis'in, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemleri sonrası elde edilen protein hidrolizatlarındaki peptitlerin molekül ağırlıkları LCMS IT-TOF ile belirlenmiştir. Bütün hidrolizatların kütle spektrumları, m/z 200–2000 Da aralığında tam tarama modunda analiz edildi. Hidroliz olmamış K_0 örneğinde moleküler ağırlıkları 267 ile 700 Da arasında değişen 11 peptit tanımlanırken, en çok peptit flavourzyme hidrolizatının ince bağırsak fazında elde edilen F-Out örneğinde tanımlanmıştır. F-Out örneğinde moleküler ağırlıkları 215 Da ile 930 Da arasında değişen 34 peptit tanımlanmıştır. Bütün hidrolizatlar göz önüne alındığında ise, moleküler ağırlıkları 202 Da ila 930 Da arasında değişen toplam 63 farklı peptit tanımlanmıştır (Tablo 4.5).

Hem enzimatik hidroliz, hem de *in-vitro* sindirim işlemleri sonra açığa çıkan hidrolizatlarda tanımlanan peptit sayısı, K_0 örneğine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca aynı enzimatik hidrolizatların ince bağırsak sindirim aşamalarında elde edilen örnekler en yüksek peptit sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. Genel olarak *in-vitro* sindirim işlemine tabi tutulmayan örnekler (K_0 , A_0 , P_0 ve F_0) göre peptit sayısı; mide sindirim aşamalarında azaldığı, ince bağırsak sindirim aşamalarında artıp en yüksek değere ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, bağırsaktan kan dolaşım sistemine geçen aşamalarda ise, ince bağırsak sindirim aşamalarına göre azaldığı gözlenmiştir. Alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile elde edilen A_0 , P_0 ve F_0 örneklerinin peptit sayısı sırasıyla 17, 14 ve 18 olarak bulunmuştur. Hidrolizatların ince bağırsak sindirim fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out örneklerinin peptit sayısı sırasıyla 16, 21, 33 ve 34 olarak bulunmuştur. Kontrol örneğinin (K_0) ve alkalaz (A_0), papain (P_0), flavourzyme (F_0) hidrolizatlarının bağırsaktan kan dolaşım sistemine geçen K-In, A-In, P-In ve F-In örneklerinde peptit sayısı sırasıyla 15, 18, 27 ve 28 olarak bulunmuştur. Mide

sindirim aşamalarında peptit sayısındaki azalmanın nedeni; sindirimin başlangıcında bulunan bazı peptitlerin tamamen parçalanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca mide sindirim aşamalarında açığa çıkan peptitlerin konsantrasyonlarında artış olabileceği de düşünülmektedir. Böylece enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların belirlenen antioksidan ve antihipertansif özellikleri, peptit sayısı ile birlikte peptit konsantrasyonuna ve amino asit dizilimine de bağlı olabileceği söylenebilir.

Molekül ağırlığı 678,4492 Da olan peptit, 11 farklı örnekte olmak üzere en çok tanımlanan peptit olmuştur. Söz konusu peptit; alkalaz hidrolizatlarının bütün fraksiyonları (A₀, A-PG, A-Out ve A-In) dahil olmak üzere K₀, K-PG, K-Out, P₀, P-PG, P-Out ve F₀ örneklerinde tanımlanmıştır. Ayrıca 678,4492 Da peptididen sonra örneklerde en çok tanımlanan peptit 452,3007 Da molekül ağırlığında olup, 678,4492 Da peptidine benzer şekilde 10 farklı örnekte (A₀ örneği hariç) tanımlanmıştır. 678,4492 Da peptidi için; *S. platensis* protein izolatında bulunduğu ve alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleriyle tamamen hidroliz olmadığı söylenebilir. Ayrıca flavourzyme hidrolizati hariç *in-vitro* sindirim aşamasında da tamamen parçalanmadığı ve kan dolaşım sistemine sadece A-In örneğinin geçebildiği söylenebilir.

Molekül ağırlığı 352,1980 Da olan peptit, sadece K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinde tanımlanmıştır. 352,1980 Da peptidi için; *S. platensis* protein izolatında bulunduğu ve enzimatik olarak tamamen hidroliz olmadığı, ancak *in-vitro* sindirimin mide fazında tamamen hidroliz olduğu söylenebilir. Bu nedenle 352,1980 Da peptidi sadece mide fazında tamamen hidroliz olduğu için *in-vitro* sindirimin hiçbir aşamasında tanımlanmamıştır. Molekül ağırlığı 287,2271 Da olan peptit, 352,1980 Da peptidi gibi K₀, A₀, P₀ ve F₀ örneklerinde tanımlanmıştır. Ancak 287,2271 Da peptidi farklı olarak; A-PG, A-In, P-In, F-PG ve F-Out örneklerinde tanımlanmıştır.

Molekül ağırlığı 339,2276 Da ve 700,4290 Da olan peptitler; K₀, K-PG, K-Out, P₀, P-PG, P-Out ve F₀ örneklerinde tanımlanmıştır. Söz konusu peptitler için; *S. platensis* protein izolatında bulunduğu ve papain ve flavourzyme enzimleriyle tamamen hidroliz olmadığı, ancak alkalaz enzimiyle tamamen hidroliz olduğu söylenebilir. Ayrıca peptitlerin kan dolaşım sistemine geçmediği de söylenebilir. 339,2276 Da ve 700,4290 Da peptitleri, alkalaz enzimiyle tamamen hidroliz olduğu için sonrasında hiçbir fraksiyonda (A₀, A-PG, A-Out ve A-In) tanımlanmamıştır. Flavourzyme hidrolizati mide sindirim aşamasında (F-PG) 700,4290 Da peptidi, ince bağırsak sindirim aşamasında (F-Out) 339,2276 Da peptidi tamamen hidroliz olduğu söylenebilir. Bu nedenle 339,2276 Da peptidi, 700,4290 Da peptididen farklı olarak F-PG örneğinde de tanımlanmıştır.

Molekül ağırlığı 364,0800 Da olan peptit; K-PG, A-PG, P-PG ve F-PG örneklerinde tanımlandığı için sadece mide sindirim aşamasında açığa çıktığı söylenebilir. 364,0800 Da peptidi ayrıca; K-Out, K-In, P-Out, F-Out ve F-In örneklerinde de tanımlanmıştır. Bu nedenle 364,0800 Da peptidi; alkalaz hidrolizati hariç diğer hidrolizatların ince bağırsak sindirim aşamasında (K-Out, P-Out ve F-Out) hidroliz olmadığı söylenebilir. Ayrıca kan dolaşım sistemine K-In ve F-In örneklerinin geçebildiği söylenebilir.

K-PG, A-PG ve P-PG örneklerinde tanımlanan 386,2430 Da molekül ağırlığındaki peptidinin, sadece mide sindirim aşamasında (flavourzyme hidrolizatı hariç) açığa çıktığı ve ince bağırsak sindirim aşamasında tamamen hidroliz olduğu söylenebilir

K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out örneklerinde 356,2435 Da, 372,2355 Da, 413,2602 Da, 431,2692 Da ve 447,2614 Da molekül ağırlığında peptitler tanımlanmıştır. Peptitler ayrıca; K-In, A-In, P-In ve F-In örneklerinde de tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitlerin, sadece ince bağırsak sindirim aşamasında açığa çıktığı ve kan dolaşım sistemine geçebildiği söylenebilir.

A-Out, P-Out ve F-Out örneklerinde 354,2302 Da, 411,2458 Da, 463,2450 Da, 465,2694 Da, 479,2352 ve 487,2462 Da molekül ağırlığında 6 peptit tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitlerin, sadece enzimatik hidrolizatların ince bağırsak sindirim aşamasında açığa çıktığı gözlenmiştir. Bu nedenle tanımlanan peptitlerin açığa çıkması için; *S. platensis* protein izolatına, *in-vitro* sindirim işleminden önce alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz işleminin uygulanması gerektiği söylenebilir. Söz konusu peptitlerin üçü (354,2302 Da, 465,2694 Da ve 487,2462 Da); A-In, P-In ve F-In örneklerinde de tanımlanmıştır. Ayrıca, F-In örneğinde 463,2450 Da ve 411,2458 Da peptitleri, P-In örneğinde 463,2450 Da peptidi tanımlanmıştır. A-In, P-In ve F-In örneklerinde tanımlanan peptitlerin kan dolaşım sistemine geçebildiği söylenebilir

Molekül ağırlığı 898,552 Da, 914,544 Da ve 930,5357 Da olan peptitler, P-Out ve F-Out örneklerinde tanımlanmıştır. Ayrıca 898,552 Da peptidi, P-In ve F-In örneklerinde de tanımlanmıştır. Söz konusu peptitlerin; sadece papain ve flavourzyme hidrolizatlarının ince bağırsak sindirim aşamasında açığa çıktığı ve sadece 898,552 Da peptidinin kan dolaşım sistemine geçebildiği söylenebilir.

Hidroliz olmamış K₀ örneğinde farklı molekül ağırlıklarına sahip peptitler tanımlanırken, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemlerinin etkisi ile moleküler ağırlıkları farklı peptitler tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitler; hidroliz ve *in-vitro* sindirimin aynı aşamalarında tanımlanabildiği gibi farklı aşamalarda açığa çıkıp sonrasında tamamen hidroliz olabildiği de gözlenmiştir (Tablo 4.5). Literatürde *Spirulina*'dan elde edilen hidrolizatlarda kromatografik ve ultra-filtrasyon yöntemler kullanılarak saflaştırılmış biyoaktif özelliğe sahip peptitler tanımlanmıştır. Zhang vd., (2022) çalışmalarında, *Spirulina platensis*'ten molekül ağırlığı 317 Da ila 775 Da arasında değişen 8 yeni peptit tanımlamışlar. Çalışmada, amino asit dizisi Val-Thr-Tyr (381,19 Da) ve Leu-Gly-Val-Pro (384,24 Da) olan iki peptidin ACE inhibitörü özellikte olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada, *Spirulina sp.* proteinini, gastrointestinal enzimler kullanılarak hidrolize edilmiş ve ardışık saflaştırmanın ardından 759 Da molekül ağırlığında güçlü ACE inhibitör peptidi elde edilmiştir. Çalışmada, ACE inhibitör peptidin amino asit dizisi Thr-Met-Glu-Pro-Gly-Lys-Pro olarak belirlenmiştir (Heo vd., 2017). Başka bir çalışmada, *Arthrospira platensis*'in alkalaz ve tripsin hidrolizatlarında, molekül ağırlıklarında 781,39 Da ila 1606,78 Da arasında değişen ve 8-15 amino asitten oluşan 11 farklı antioksidan ve ACE inhibitör peptitleri elde edilmiştir (Wang vd., 2021). Vo vd., (2013) çalışmalarında, *Spirulina maxima*'dan tripsin, α -kimotripsin ve pepsin enzimleri ile elde ettikleri

hidrolizatta 686 Da (LDAVNR) ve 655 Da (MMLDF) molekül ağırlıklarında anti-inflamatuar özelliğe sahip iki peptit tanımlamışlar. Tez çalışmasında tanımlanan 3 peptidin (381,8308 Da, 384,2092 Da, 443,2397 Da ve 930,5357 Da) moleküler ağırlıkları yapılan çalışmalarda (Liu vd., 2022; Zhang vd., 2022) benzer olduğu görülmüştür. Ancak moleküler ağırlıklarının benzer olması aynı peptitler olduğunu söylemek için yeterli değil, peptitlerin amino asit dizilimlerinin de aynı olması gerekir. Biyoaktif peptitler, genellikle 2–20 amino asit oluşan kısa zincirli protein parçalarıdır. Bu nedenle; tez çalışmasında tanımlanan peptitlerin, 202 Da ila 930 Da arasında değişen molekül ağırlığına sahip olduğu dikkate alındığında, potansiyel olarak biyoaktif peptit olabileceği söylenebilir.



Tablo 4.5. LCMS IT-TOF ile belirlenen *S. platensis* peptitlerinin (protein hidrolizatlarının) molekül ağırlıkları.

Moleküler iyon (m/z)	Teorik kütle (Da)	K ₀	K-PG	K-Out	K-In	A ₀	A-PG	A-Out	A-In	P ₀	P-PG	P-Out	P-In	F ₀	F-PG	F-Out	F-In
203,1209	202,1209					+								+			
215,0506	214,0506				+								+		+	+	+
237,0297	236,0297												+		+	+	+
245,1625	244,1625			+		+	+					+		+		+	
258,0840	257,0840												+			+	+
260,1704	259,1704				+	+								+			
268,0782	267,0782	+	+											+			
274,1589	273,1589	+		+	+	+	+						+	+			+
279,1435	278,1435				+	+	+										
288,1741	287,1741			+	+	+	+				+	+	+			+	+
288,2271	287,2271	+				+	+		+	+			+	+	+	+	
295,1360	294,1360													+	+		
315,0732	314,0732				+								+		+	+	+
331,1598	330,1598	+				+					+			+			
338,1484	337,1484					+	+										
339,2352	338,2352											+				+	
340,2276	339,2276	+	+	+						+	+	+		+	+		
342,2031	341,2031													+		+	
343,2609	342,2609							+	+			+	+	+	+	+	+
351,1807	350,1807					+				+				+			
353,1980	352,1980	+				+				+				+			
355,2302	354,2302							+	+			+	+			+	+
357,2435	356,2435			+	+			+	+			+	+			+	+
358,2322	357,2471					+	+										
365,0800	364,0800		+	+	+		+				+	+			+	+	+
373,2355	372,2355			+	+			+	+	+		+	+			+	+
382,8308	381,8308	+												+			
385,2092	384,2092									+	+	+					
387,2430	386,2430		+				+				+						
391,2464	390,2464				+			+	+			+	+				+
392,0824	391,0824	+	+											+			

Tablo 4.5. (devamı) LCMS IT-TOF ile belirlenen *S. platensis* peptitlerinin (protein hidrolizatlarının) molekül ağılıkları.

Moleküler iyon (m/z)	Teorik kütle (Da)	K ₀	K-PG	K-Out	K-In	A ₀	A-PG	A-Out	A-In	P ₀	P-PG	P-Out	P-In	F ₀	F-PG	F-Out	F-In
401,2577	400,2577		+			+					+						
408,2711	407,2711											+	+				+
412,2458	411,2458							+				+				+	+
413,2357	412,2357			+					+			+	+			+	+
414,2602	413,2602			+	+			+	+			+	+			+	+
415,0993	414,0993				+								+	+		+	+
430,2575	429,2575				+			+	+	+		+	+			+	+
432,2692	431,2692			+	+			+	+			+	+			+	+
444,2397	443,2397		+	+													
448,2614	447,2614			+	+			+	+			+	+			+	+
450,2760	449,2760							+				+	+				+
453,3007	452,3007	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+			
464,2450	463,2450							+				+	+			+	+
466,2694	465,2694							+	+			+	+			+	+
470,2878	469,2878			+					+	+		+	+				
472,2313	471,2313					+		+	+	+	+	+	+				+
480,2352	479,2352							+				+				+	
482,2499	481,2499											+				+	
488,2462	487,2462							+	+			+	+			+	+
498,2940	497,2940									+						+	
504,2252	503,2252							+	+								
543,2602	542,2602					+	+										
554,2450	553,2450					+	+										
555,2981	554,2981							+		+		+				+	
626,3240	625,3240															+	+
679,4492	678,4492	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+			
701,4290	700,4290	+	+	+						+	+	+		+			
726,3404	725,3404															+	+
839,4809	838,4809							+					+			+	+
899,5520	898,5520											+	+			+	+
915,5440	914,5440											+				+	
931,5357	930,5357											+				+	



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *Spirulina platensis* mikroalginin protein ve protein hidrolizatlarının bazı biyoaktif özellikleri incelenmiştir. *S. platensis* tozundan alkali özütlemeye ve izoelektrik çöktürme yöntemine ile elde edilen protein konsantresi alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen enzimatik hidrolizatlar ve hidroliz olmamış kontrol örneği *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemine tabi tutulmuştur. Böylece mikroalgin yapısında bulunan biyoaktif bileşenlerin sindirim sırasındaki değişimi ortaya konuldu. Enzimatik hidroliz ve *in-vitro* gastrointestinal sindirim işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatların protein içerikleri, hidroliz dereceleri, ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) inhibitör etkileri, antioksidan aktiviteleri (FRAP, DPPH ve ABTS) ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Ayrıca hidrolizatların fenolik bileşenleri ve hidrolizatlarda açığa çıkan peptitlerin molekül ağırlıkları da belirlenmiştir.

Alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz sonrası elde edilen A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının K₀ örneğine göre hidroliz derecesinde artış olduğu gözlenmiştir. A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının hidroliz dereceleri sırasıyla %9,18, %7,81 ve %5,97 olarak bulunmuştur. K₀, A₀, P₀ ve F₀ hidrolizatlarının *in-vitro* sindirim işleminden sonra elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri incelendiğinde; A₀ hidrolizatının hidroliz derecesi %9,18 iken; mide fazında (A-PG) %12,31'e yükseldiği, bağırsak fazında (A-Out) %17,61 ile en yüksek değere sahip olduğu, dolaşım fazında (A-In) da %13,68 olduğu gözlenmiştir. Genel olarak hidroliz derecesi, *in-vitro* sindirim işlemine tabi tutulmayan örnekler (K₀, A₀, P₀ ve F₀) göre; mide sindirim aşamalarında (PG) arttığı ve ince bağırsak sindirim aşamalarında (Out) en yüksek değere ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, bağırsaktan dolaşım sistemine geçen aşamalarda (In) ise, ince bağırsak sindirim aşamalarına göre azaldığı gözlenmiştir.

S. platensis protein hidrolizatları ACE'yi yüksek oranda inhibe ettiği ve gerek hidroliz öncesi gerekse hidroliz sonrası örneklerde %İNH değerlerinin ortalama %95'in üzerinde olduğu görülmüştür. Hidroliz olmamış *S.platensis* proteinleri (K₀) diğer tüm örneklerle karşılaştırıldığında en yüksek IC₅₀ değerine (1,34 mg protein/ml) sahip olduğu gözlenmiştir. *S.platensis* proteinlerinin alkalaz, papain ve flavourzyme enzimleri ile hidrolizi sonrası elde edilen hidrolizatlar arasında A₀ örneği en düşük IC₅₀ değerine sahip olup, 0,57 mg protein/ml olarak bulunmuştur. *In-vitro* sindirim işlemi sırasında mide ve ince bağırsak sindirim fazlarında elde edilen K-PG ve K-Out örnekleri tüm örnekler arasında en düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. K-PG ve K-Out örnekleri K₀ örneğine göre düşük IC₅₀ değerleri yaklaşık %93 azalarak sırasıyla 0,09 mg protein/ml ve 0,10 mg protein/ml olarak bulunmuştur. Hidroliz süresince elde edilen örneklerin hidroliz olmamış kontrol örneğine göre IC₅₀ değerlerindeki azalma, ACE inhibisyon etkilerinin arttığı anlamına gelmektedir. Buna göre K₀ örneği en düşük, K-PG ve K-Out örnekleri en yüksek ACE inhibisyon etkiye sahip olduğu söylenebilir. Böylece en yüksek ACE inhibisyon etkiye sahip K-PG ve K-Out örnekleri, hidroliz olmamış K₀ örneğinden sırasıyla 13,02 ve 14,21 kat daha fazla inhibisyon etkisi gösteriyor denilebilir.

Spirulina protein hidrolizatlarının FRAP yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri 0,82 ile 31,87 mg TE/g KM arasında değişmiştir. *Spirulina* protein hidrolizatlarının en düşük ve en yüksek DPPH-radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri sırasıyla P-In ve K-PG örneklerinde 0,54 ve 4,96 mg TE/g KM olarak bulunmuştur. *Spirulina* protein hidrolizatlarının ABTS-radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri 16,42 ile 678,61 mg TE/g KM arasında değişmiştir. *Spirulina* protein hidrolizatlarının DPPH ve ABTS radikal süpürme antioksidan aktiviteleri incelendiğinde FRAP yöntemine göre benzerlik göstermektedir. ABTS yöntemine göre K₀ örneğinin radikal süpürme aktivitesi *in-vitro* sindirim sonrası artmış ve en yüksek değerler ince bağırsak fazında elde edilen K-Out, A-Out, P-Out ve F-Out hidrolizatlarda bulunmuştur.

Spirulina platensis protein hidrolizatlarının fenolik bileşen içerikleri gallik asit, kateşin, klorojenik asit, şiranjik asit, kumarik asit, mirisetin, kuersetin ve izoramnetin fenolik standartları kullanılarak incelenmiştir. Hidrolizatlarda fenolik bileşen miktarı *in-vitro* sindirim işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlarda kontrol örneğine göre fenolik bileşenlerin miktarı genel olarak arttığı gözlenmiştir. Ancak, enzimatik hidroliz işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlarda (A₀, P₀ ve F₀) arttığı, sonrasında *in-vitro* sindirim işlemi uygulandığında ise azaldığı veya tanımlanmadığı gözlenmiştir.

Hidroliz olmamış K₀ örneğinde farklı molekül ağırlıklarına sahip peptitler tanımlanırken, enzimatik hidroliz ve *in-vitro* sindirim işlemlerinin etkisi ile moleküler ağırlıkları farklı peptitler tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitler; hidroliz ve *in-vitro* sindirimin aynı aşamalarında tanımlanabildiği gibi farklı aşamalarda açığa çıkıp sonrasında tamamen hidroliz olabildiği de gözlenmiştir. Tanımlanan peptitlerin, 202 Da ile 930 Da arasında değişen molekül ağırlığına sahip olduğu dikkate alındığında, potansiyel olarak biyoaktif peptit olabileceği söylenebilir.

Araştırmacıların, artan beslenme ve sağlık sorunlarını ortadan kaldırmak için biyoaktif bileşiklerin doğal bir kaynağı olan mikroalgleri kullandıkları bilinmektedir. Mikroalglerden çeşitli biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen biyoaktif bileşikler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın sonucu, *S. platensis* proteininin iyi bir antihipertansif, antioksidan ve fenolik bileşen kaynağı olduğunu ve fonksiyonel gıdalarda ve nutrasötiklerde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, *S. platensis* proteininin hidrolizi daha fazla ACE inhibisyon aktivitesi, antioksidan aktivite ve toplam fenolik içerik ile sonuçlanmıştır. ACE inhibisyonu ve antioksidan aktiviteye sahip hidrolizatların yapısındaki peptitler saflaştırılarak amino asit dizilimi belirlenip önemli biyolojik işlevlere sahip gıda takviyeleri olarak kullanılabilir. Ayrıca *S. platensis* protein hidrolizatlarından elde edilen biyoaktif peptitler, ve insan sağlığını geliştirme ve hastalık riskini azaltma potansiyeline sahip nutrasötikler ve ilaçlar üretmek için çok yönlü ham maddeler olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Abuine, R., Rathnayake, A. U. and Byun H. (2019). “Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates.” *Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 22, No. 10, pp. 1–14.

Acquah, C., Tibbetts, S. M., Pan, S., and Udenigwe, C. (2020). Nutritional quality and bioactive properties of proteins and peptides from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. pp. 493–531.

Ahmadifard, N., Murueta, J. H. C., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A., and Jamali, H. (2016). “Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE.” *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 53, No. 2, pp. 1279–1284.

Alper, A. B., and Calhoun, D. A. (1999). “Contemporary management of refractory hypertension.” *Current Hypertension Reports*, Vol. 1, No. 5, pp. 402–407.

Aluko, R. E. (2012). Bioactive Peptides. In *Functional Foods and Nutraceuticals; Food Science Text Series*. New York, USA: Springer New York, pp. 37–61.

Alzahrani, M. A. J., Perera, C. O., and Hemar, Y. (2018). “Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their in vitro antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*.” *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 53, No. 3, pp. 676–682.

Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., and Shahidi, F. (2015). “Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin.” *Journal of Functional Foods*, Vol. 18, No.1, pp. 1125–1137.

Ampofo, J., and Abbey, Lord. (2022). “Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry.” *Foods*, Vol. 11, No. 12, pp. 1–20.

Arjeh, E., Rostami, H., Pirsä, S., and Fathi, M. (2022). “Synthesis and characterization of novel *Spirulina* protein isolate (SPI)-based hydrogels through dual-crosslinking with genipin/Zn²⁺.” *Food Research International*, Vol. 162, No.1, pp. 1-8.

Arslan, R., and Aksay, S. (2022). “Investigation of sensorial and physicochemical properties of yoghurt colored with phycocyanin of *Spirulina platensis*.” Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 46, No. 6, pp. 1–5.

Arslan, R., Eroglu, E. C., and Aksay, S. (2021). “Determination of bioactive properties of protein and pigments obtained from *Spirulina platensis*.” Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 45, No. 2, pp. 1–7.

Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Kalashnikova, O., Kashirskikh, E., Prosekov, A., ... Dolganyuk, V. (2022). “Algae: Study of Edible and Biologically Active Fractions, Their Properties and Applications.” Plants, Vol. 11, No.780, pp. 1–30.

Babuskin, S., Krishnan, K. R., Babu, P. A. S., Sivarajan, M., and Sukumar, M. (2014).” Functional Foods Enriched with Marine Microalga *Nannochloropsis oculata* as a Source of ω -3 Fatty Acids.” Food Technol. Biotechnol., Vol. 52, No. 3, pp. 292–299.

Barka, A., Amira, A. B., Francis, F., and Blecker, C. (2018). “Physicochemical characterization of colored soluble protein fractions extracted from *Spirulina* (*Spirulina platensis*).” Food Science and Technology International, Vol. 24, No. 8, pp. 651–663.

Barkia, I., Al-Haj, L., Abdul Hamid, A., Zakaria, M., Saari, N., and Zadjali, F. (2019). “Indigenous marine diatoms as novel sources of bioactive peptides with antihypertensive and antioxidant properties.” International Journal of Food Science and Technology, Vol. 54, No. 5, pp. 1514–1522.

Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., and Gattuso, G. (2011). “Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties.” Food Research International, Vol. 44, No. 7, pp. 2190–2197.

Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., and Raymundo, A. (2013). “Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products.” Algal Research, Vol. 2, No. 2, pp. 164–173.

Begum, N., Qi, F., Yang, F., Khan, Q. U., Fu, Q., Li, J., and Wang, X. (2024). “Nutritional Composition and Functional Properties of *A. platensis* -Derived Peptides : A Green and Sustainable Protein-Rich Supplement.” Processes, Vol. 12, No.2608, pp. 1–27.

Benito-Vázquez, I., Garrido-Romero, M., Díez-Municio, M., and Moreno, F. J. (2024). “Cysteine proteases from plants: Utilization in foods and nutraceuticals and characterization approaches for quality management.” *Applied Food Research*, Vol. 4, No. 2, pp. 1–15.

Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay.” *Analytical Biochemistry*, Vol. 239, No.1, pp. 70–76.

Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., and Watanabe, F. (2020). “Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health.” *Nutrients*, Vol. 12, No. 9, pp. 1–25.

Bleakley, S., and Hayes, M. (2017). “Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production.” *Foods*, Vol. 6, No. 5, pp. 1-34.

Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. de A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Branco, I. G., and Haminiuk, C. W. I. (2022). “Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends.” *Food Chemistry: Molecular Sciences*, Vol. 5, No. 1, pp. 1-12.

Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., and Arnoldi, A. (2014). “Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Lupin (*Lupinus*) Proteins for Producing ACE-Inhibitory Peptides.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 62, No. 8, pp. 1846–1851.

Buono, S., Langellotti, A. L., Martello, A., Rinna, F., and Fogliano, V. (2014).” Functional ingredients from microalgae.” *Food Funct.*, Vol. 5, No. (8), pp. 1669–1685.

Cai, W.-W., Hu, X.-M., Wang, Y.-M., Chi, C.-F., and Wang, B. (2022). “Bioactive Peptides from Skipjack Tuna Cardiac Arterial Bulbs: Preparation, Identification, Antioxidant Activity, and Stability against Thermal, pH, and Simulated Gastrointestinal Digestion Treatments.” *Marine Drugs*, Vol. 20, No. 10, pp. 1-25.

Chacón-Lee, T. L., and González-Mariño, G. E. (2010). “Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 9, No. 6, pp. 655–675.

Chalamaiah, M., Yu, W., and Wu, J. (2018). “Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review.” *Food Chemistry*, Vol. 245, No. 1, pp. 205–222.

Coskun, O. (2016). “Separation techniques: Chromatography.” *Nothorn Clinics of Istanbul*, Vol. 3, No. 2, pp. 156–160.

Carvalho Oliveira, L., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Elena Cartea, M., Francisco, M., Cristianini, M., and Peñas, E. (2024). “High pressure-assisted enzymatic hydrolysis potentiates the production of quinoa protein hydrolysates with antioxidant and ACE-inhibitory activities.” *Food Chemistry*, Vol. 447, No. 1, pp. 1–10.

Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., ... Sukhikh, S. (2020). “Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts.” *Biomolecules*, Vol. 10, No. 8, pp. 1-24.

Du, J., Xiao, M., Sudo, N., and Liu, Q. (2024). “Bioactive peptides of marine organisms : Roles in the reduction and control of cardiovascular diseases.” *Food Science and Nutrition*, Vol. 12, No. 1, pp. 5271–5284.

Ejike, C. E. C. C., Collins, S. A., Balasuriya, N., Swanson, A. K., Mason, B., and Udenigwe, C. C. (2017). “Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health.” *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 59, No.1, pp. 30–36.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., and Decker, E. A. (2008). “Antioxidant Activity of Proteins and Peptides.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 48, No. 5, pp. 430–441.

Fan, X., Bai, L., Mao, X., and Zhang, X. (2017). “Novel peptides with anti-proliferation activity from the *Porphyra haitanesis* hydrolysate.” *Process Biochemistry*, Vol. 60, No. 1, pp. 98–107.

Fernando, R., Sun, X., and Rupasinghe, H. P. V. (2024). “Production of Bioactive Peptides from Microalgae and Their Biological Properties Related to Cardiovascular Disease.” *Macromol*, Vol. 4, No. 3, pp. 582–597.

Figueira, S., Crizel, T. de M., and Salas-Mellado, M. de las M. (2011). “Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*.” *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 14, No. 4, pp. 308–316.

Fitzgerald, C., Gallagher, E., Tasdemir, D., and Hayes, M. (2011). “Heart Health Peptides from Macroalgae and Their Potential Use in Functional Foods.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, No. 13, pp. 6829–6836.

Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., and Raymundo, A. (2013). “*Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA’s source.” *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 50, No. 1, pp. 312–319.

Gao, J., Liu, Q., Zhao, L., Yu, J., Wang, S., Cao, T., ... Wei, Y. (2021). “Identification and Antihypertension Study of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from the Skirt of *Chlamys farreri* Fermented with *Bacillus natto*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 69, No. 1, pp. 146–158.

Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., and Gigova, L. (2009). “Cancer Protective Action of Polysaccharide, Derived from Red Microalga *Porphyridium Cruentum* — A Biological Background.” *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Vol. 23, No. 1, pp. 783–787.

Gaur, K., Wal, A., Sharma, P., Parveen, A., Singh, P., Mishra, P., ... Mishra, N. T. P. (2024). “Exploring the Nutritional and Medicinal potential of *Spirulina*.” *Natural Resources for Human Health*, Vol. 4, No. 1, pp. 277–286.

Gead, P., Moreira, C., Silva, M., Nunes, R., Madureira, L., Rocha, C. M. R., ... Teixeira, J. A. (2021). “Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties.” *Bioresource Technology*, Vol. 332, No. 1 pp. 1-14.

Gentscheva, G., Milkova-Tomova, I., Pehlivanov, I., Gugleva, V., Nikolova, K., Petkova, N., ... Pisanova, E. (2022). Chemical Characterization of Selected Algae and Cyanobacteria from Bulgaria as Sources of Compounds with Antioxidant Activity. *Applied Sciences*, Vol. 12, No.1, pp. 1–17.

Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., and Raymundo, A. (2007). “*Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 8, No. 1, pp. 433–436.

Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., Sousa, I., and Empis, J. (2006). “*Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions.” *European Food Research and Technology*, Vol. 222, No. 1, pp. 362–367.

Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A., and Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. In K. N. Papadopoulos (Ed.), *Food Chemistry Research Developments* (pp. 75–112). Hauppauge, New York, USA: Nova Science Publishers Inc.

Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., and Raymundo, A. (2008). "Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 88, No. 5, pp. 891–896.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., and Malcata, F. X. (2011). "Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work." *Biotechnology Progress*, Vol. 27, No. 3, pp. 597–613.

Guimarães Drummond e Silva, F., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Iglesias, A. H., Reyes Reyes, F. G., and Netto, F. M. (2017). "Influence of Protein–Phenolic Complex on the Antioxidant Capacity of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 65, No. 4, pp. 800–809.

Guldas, M., Ziyank-Demirtas, S., Sahan, Y., Yildiz, E., and Gurbuz, O. (2021). "Antioxidant and anti-diabetic properties of *Spirulina platensis* produced in Turkey." *Food Science and Technology*, Vol. 41, No. 3, pp. 615–625.

Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Oral, İ., Öncel, S. Ş., and Elibol, M. (2020). "Evaluation of Several Microalgal Extracts as Bioactive Metabolites as Potential Pharmaceutical Compounds." In *IFMBE Proceedings*, Vol. 73, No. 1, pp. 267–272.

Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Galar-Martínez, M., García-Rodríguez, R. V., Chamorro-Cevallos, A. G., Hernández-Reyes, A. G., and Elizdath, M.-G. (2015). "Antioxidant Effect of *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* on Chronic Inflammation Induced by Freund's Complete Adjuvant in Rats." *Journal of Medicinal Food*, pp. 1–7.

Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Álvarez, C., Schmitt, P., ... Rojas, V. (2019). "Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement." *Marine Drugs*, Vol. 17, No. 8, pp. 1-19.

Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. (2008). "A review of culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. No. 1034. Rome, FAO. 33p.

Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2013). "In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates." *Journal of Applied Phycology*, Vol. 25, No. 6, pp. 1793–1803.

Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., and FitzGerald, R. J. (2015). “Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*.” Food Chemistry, Vol. 172, No. 1, pp. 400–406.

Hartmann, R., and Meisel, H. (2007). “Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications.” Current Opinion in Biotechnology, Vol. 18, No. 2, pp. 163–169.

Hayes, M. (Ed.). (2012). Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications. Springer Handbook of Marine Biotechnology. Boston, MA: Springer US.

Hayes, M. (2013). Biological Activities of Proteins and Marine-derived Peptides from Byproducts and Seaweeds. In Marine Proteins and Peptides (pp. 139–165). Chichester, UK: John Wiley and Sons, Ltd.

He, H. L., Chen, X. L., Wu, H., Sun, C. Y., Zhang, Y. Z., and Zhou, B. C. (2007). “High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis.” Bioresource Technology, Vol. 98, No. 18, pp. 3499–3505.

Heo, S. Y., Ko, S. C., Kim, C. S., Oh, G. W., Ryu, B., Qian, Z. J., ... Jung, W. K. (2017). “A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme- and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells.” International Journal of Molecular Medicine, Vol. 39, No. 5, pp. 1072–1082.

Hoseini, S. M., Khosravi-Darani, K., and Mozafari, M. R. (2013). “Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae.” Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Vol. 13, No. 8, pp. 1231–1237.

Hu, S., Fan, X., Qi, P., and Zhang, X. (2019). Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*.” Journal of Functional Foods Journal, Vol. 56, pp. 333–341.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., and Castro-Puyana, M. (2012). “Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In M. Hayes (Ed.), Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications (pp. 55–98). London, Great Britain: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2>

Ijaola, A. O., Akamo, D. O., George, T. T., Sengul, A., Adediji, M. Y., and Asmatulu, E. (2024). "Algae as a potential source of protein: A review on cultivation, harvesting, extraction, and applications." *Algal Research*, Vol. 77, pp. 1-18.

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., and Kaymak-Ertekin, F. (2018). "Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques." *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 70, pp. 78–88.

Jemil, I., Mora, L., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M.-C., Hajji, M., ... Toldrá, F. (2016). "A peptidomic approach for the identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in sardinelle protein hydrolysates fermented by *Bacillus subtilis* A26 and *Bacillus amyloliquefaciens* An6." *Food Research International*, Vol. 89, pp. 347–358.

Jo, C., Khan, F. F., Khan, M. I., and Iqbal, J. (2017). "Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions." *Food Reviews International*, Vol. 33, No. 1, pp. 44–61.

Joshi, S. M. R., Bera, M. B., and Panesar, P. S. (2014). "Extrusion cooking of maize/*Spirulina* mixture: Factors affecting expanded product characteristics and sensory quality." *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 38, pp. 655–664.

Khalid, S., Chaudhary, K., Aziz, H., Amin, S., Sipra, H. M., Ansar, S., ... Onyeaka, H. (2024). "Trends in extracting protein from microalgae *Spirulina platensis* , using innovative extraction techniques: mechanisms, potentials, and limitations." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1–17.

Kim, N. H., Jung, S. H., Kim, J., Kim, S. H., Ahn, H. J., and Song, K. Bin. (2014). "Purification of an iron-chelating peptide from *Spirulina* protein hydrolysates." *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, Vol. 57, No. 1, pp. 91–95.

Kim, S.-K. (Ed.). (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (1 edition). London, UK: Elsevier.

Kit, Y., and Chang, J. (2024). "Proteins and bioactive peptides from algae : Insights into antioxidant, anti-hypertensive, anti-diabetic and anti-cancer activities." *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 145, pp. 1-10.

Koru, E. (2012). Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standarts. In Y. El-Samragy (Ed.), Food Additive (pp. 191–202). ISBN: 978-953-51-0067-6. InTech.

Kula, E., Kocadag Kocazorbaz, E., Moulahoum, H., Alpat, S., and Zihnioglu, F. (2020). “Extraction and characterization of novel multifunctional peptides from *Trachinus Draco* (greater weever) myofibrillar proteins with ACE/DPP4 inhibitory, antioxidant, and metal chelating activities.” Journal of Food Biochemistry, Vol. 44, No. 5, pp. 1–9.

Lemes, A. C., Takeuchi, K. P., Carlos, J., and Carvalho, M. De. (2012). “Fresh Pasta Production Enriched with *Spirulina platensis* Biomass.” Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol. 55, No. 5, pp. 741–750.

Lin, M. Y., and Yen, C. L. (1999). “Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation Product-Scavenging Ability of Yogurt Organisms.” Journal of Dairy Science, Vol. 82, No. 8, pp. 1629–1634.

Liu, J., Bai, X., and Fu, P. (2022). “In silico and in vitro assessment of bioactive peptides from *Arthrospira platensis* phycobiliproteins for DPP-IV inhibitory activity, ACE inhibitory activity, and antioxidant activity.” Journal of Applied Phycology, Vol. 34, No. 3, pp. 1497–1511.

Liu, Li-chuang, Hu, Z., Jia, J., and Liu, T. (2009). “ACE Inhibitory Activity of Hydrolysates of Phycobiliproteins from *Spirulina*.” Food Science, Vol. 30, No. 13, pp. 212–217.

Liu, L., He, M., Yang, Z., Wang, H., Zhang, X., He, J.,... Liao, Z. (2022). “Myticofensin, a novel antimicrobial peptide family identified from *Mytilus coruscus*.” Fish and Shellfish Immunology, Vol. 131, pp. 817–826.

López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., and Gómez Oliván, L. M. (2022). “Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins.” Molecules, Vol. 27, No. 4, pp. 1–32.

Lordan, S., Ross, R. P., and Stanton, C. (2011). “Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases.” Marine Drugs, Vol. 9, No. 6, pp. 1056–1100.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). “Protein measurement with the Folin phenol reagent.” J. Biol. Chem., Vol. 193, No. 1, pp. 265–275.

Lu, J., Ren, D.-F., Xue, Y.-L., Sawano, Y., Miyakawa, T., and Tanokura, M. (2010). "Isolation of an Antihypertensive Peptide from Alcalase Digest of *Spirulina platensis*." *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 58, No. 12, pp. 7166–7171

Malik, P., Kempanna, C., Murthy, N., and Anjum, A. (2013). "Quality Characteristics of Yoghurt Enriched with *Spirulina* Powder." *Mysore J. Agric*, Vol.47, No. 2, pp. 354–359.

Mallikarjun Gouda, K. G., Sankar Udaya, K., Sarada, R., and Ravishankar, G. A. (2014). "Supercritical CO₂ extraction of functional compounds from *Spirulina* and their biological activity." *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 52, No. 6, pp. 3627–3633.

Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., and Jing, K. (2016). "Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent." *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 109, pp. 282–296.

Mao, Z., Jiang, H., Sun, J., Zhao, Y., Gao, X., and Mao, X. (2024). "Research progress in the preparation and structure-activity relationship of bioactive peptides derived from aquatic foods." *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 147, pp. 1-14.

Marco, E. R. De, Steffolani, M. E., Martínez, C. S., and León, A. E. (2014). "Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta." *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 58, No. 1, pp. 102–108.

Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Hernández, J. L. M., Rodríguez-Jasso, R. M., ... Aguilar-González, C. N. (2019). "Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry." In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 221–246). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>

McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., and Stewart, D. (2005). "Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, No. 15, pp. 5896–5904.

Morsy, O. M., Sharoba, A. M., El-Desouky, A. I., Bahlol, H. E. M., and Abd El Mawla, E. M. (2014). "Production and evaluation of some extruded food products using *Spirulina* algae." *Annals of Agricultural Science*, Vol. 52, No. 4, pp. 329–342.

Mosibo, O. K., Ferrentino, G., and Udenigwe, C. C. (2024). “Microalgae Proteins as Sustainable Ingredients in Novel Foods : Recent Developments and Challenges.” *Foods*, Vol. 13, No. 5, pp. 1–28.

Murray, B. A., and FitzGerald, R. J. (2007). “Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production.” *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 13, No. 8, pp. 773–791.

Murthy, K. N. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., and Ravishankar, G. A. (2005). “In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga.” *Life Sciences*, Vol. 76, pp. 1381–1390.

Ng, K. L., Ayob, M. K., Said, M., Osman, M. A., and Ismail, A. (2013). “Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity.” *Industrial Crops and Products*, Vol. 43, No. 1, pp. 725–731.

O’Connor, J., Garcia-vaquero, M., Meaney, S., and Tiwari, B. K. (2022). “Bioactive Peptides from Algae: Traditional and Novel Generation Strategies, Structure-Function Relationships, and Bioinformatics as Predictive Tools for Bioactivity.” *Marine Drugs*, Vol. 20, No. 5, pp. 1–16.

Olena, Z., Yang, Y., TingTing, Y., XiaoTao, Y., HaiLian, R., Xun, X., ... HaiLun, H. (2022). “Simultaneous preparation of antioxidant peptides and lipids from microalgae by pretreatment with bacterial proteases.” *Bioresource Technology*, Vol. 348, pp. 1-11.

Otero, C., and Verdasco-Martín, C. M. (2023). “Preparation and Characterization of a Multicomponent *Arthrospira platensis* Biomass Hydrolysate with Superior Anti-Hypertensive, Anti-Hyperlipidemic and Antioxidant Activities via Selective Proteolysis.” *Marine Drugs*, Vol. 21, No. 4, pp. 1-21.

Ovando, C. A., Carvalho, J. C. de, Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T., and Soccol, C. R. (2018). “Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina* : A review.” *Food Reviews International*, Vol. 34, No. 1, pp. 34–51.

Özyurt, G., Uslu, L., Yuvka, I., Gökdoğan, S., Atcı, G., Ak, B., and Işık, O. (2015). “Evaluation of the Cooking Quality Characteristics of Pasta Enriched with *Spirulina platensis*.” *Journal of Food Quality*, Vol. 38, pp. 268–272.

Panyam, D., and Kilara, A. (1996). "Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification." *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 7, No. 4, pp. 120–125.

Park, H., and Lee, H. (2016). The influence of obesity on the effects of *Spirulina* supplementation in the human metabolic response of Korean elderly. *Nutrition Research and Practice*, Vol. 10, No. 4, pp. 418–423.

Patras, D., Moraru, C. V., and Socaciu, C. (2019). "Bioactive Ingredients from Microalgae: Food and Feed Applications. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*." *Food Science and Technology*, Vol. 76, No. 1, pp. 1-9.

Pimentel, F. B., Alves, R. C., Harnedy, P. A., Fitzgerald, R. J., and Oliveira, M. B. P. P. (2019). "Macroalgal-derived protein hydrolysates and bioactive peptides : Enzymatic release and potential health enhancing properties." *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 93, pp. 106–124.

Poddar, S., and Yu, J. (2024). "Angiotensin-Converting Enzyme and Renin-Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates Produced by Alcalase Hydrolysis of Peanut Protein." *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 25, No. 13, pp. 1–14.

Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri, M., and Moovendhan, M. (2020). "Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect." *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 153, pp. 256–263.

Raja, R., Coelho, A., Hemaiswarya, S., Kumar, P., Carvalho, I. S., and Alagarsamy, A. (2018). "Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool." *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 7, No. 4, pp. 740–747.

Raposo, M. F. de J., de Morais, R. M. S. C., and Bernardo de Morais, A. M. (2013). "Health applications of bioactive compounds from marine microalgae." *Life Sciences*, Vol. 93, No.15, pp. 479–486.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26, No. 9, pp. 1231–1237.

Richmond, A. (Ed.). (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. New Jersey, USA: Blackwell Publishing.

Richmond, A., and Hu, Q. (Eds.). (2013). Handbook of Microalgal Culture. 2013 JohnWiley and Sons, Ltd. Published 2013 by Blackwell Publishing Ltd. (Second). Oxford, UK: John Wiley and Sons, Ltd.

Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmailzadeh Kenari, R. (2020). “Antioxidant and antibacterial activities of C-phycoerythrin from common name *Spirulina platensis*.” Iranian Journal of Fisheries Sciences, Vol. 19, No. 4, pp. 1911–1927.

Şahin, Y., and Akyurt, İ. (2010). “Planktons and Photobioreactors.” The Black Sea Journal of Sciences, Vol. 1, No. 2, pp. 83–92.

Samarakoon, K., and Jeon, Y. (2012). “Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review.” Food Research International, Vol. 48, No. 2, pp. 948–960.

Sanjeeva, K. K. A., Fernando, I. P. S., Samarakoon, K. W., Lakmal, H. H. C., Kim, E.-A., Kwon, O.-N., ... Jeon, Y.-J. (2016). “Anti-inflammatory and anti-cancer activities of sterol rich fraction of cultured marine microalga *Nannochloropsis oculata*.” Algae, Vol. 31, No. 3, pp. 277–287.

Sharma, D., Gite, S., and Tuohy, M. G. (2024). “Exploring the Physicochemical Characteristics of Marine Protein Hydrolysates and the Impact of In Vitro Gastrointestinal Digestion on Their Bioactivity.” Marine Drugs, Vol. 22, No. 452, pp. 1–38.

Sharoba, A. M. (2014). “Nutritional value of *Spirulina* and its use in the preparation of some complementary baby food formulas.” Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, Vol. 20, No. 4, pp. 330–350.

Sheih, I.-C., Fang, T. J., Wu, T.-K., and Lin, P.-H. (2010). “Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste.” Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 58, No. 2, pp. 1202–1207.

Shih, M. F., and Cherng, J. Y. (2012). “Protective Effects of Chlorella-Derived Peptide Against UVC-Induced Cytotoxicity through Inhibition of Caspase-3 Activity and Reduction of the Expression of Phosphorylated FADD and Cleaved PARP-1 in Skin Fibroblasts.” Molecules, Vol. 17, No.8, pp. 9116–9128.

Siahbalaee, R., Kavoosi, G., and Noroozi, M. (2021). "Protein nutritional quality, amino acid profile, anti-amylase and anti-glucosidase properties of microalgae: Inhibition and mechanisms of action through in vitro and in silico studies." *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 150, pp. 1-11.

Siddhnath, Surasani, V. K. R., Singh, A., Singh, S. M., Hauzoukim, Murthy, L. N., and Baraiya, K. G. (2024). "Bioactive compounds from micro - algae and its application in foods : a review." *Discover Food*, Vol. 4, No. 27, pp. 1-20.

Silva, M. F., Casazza, A. A., Ferrari, P. F., Aliakbarian, B., Converti, A., Bezerra, R. P., ... Perego, P. (2017). "Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques." *Algal Research*, Vol. 25, pp. 391–401.

Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V, and Los, D. A. (2024). " *Spirulina/Arthrospira/Limnospira*— Three Names of the Single Organism." *Foods*, Vol. 13, No. 17, pp. 1-24.

Singh, D. P., Prabha, R., Verma, S., and Meena, K. K. (2017). "Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria." *3 Biotech*, Vol. 7, No. 134, pp. 1–14.

Skjånes, K., Aesoy, R., Herfindal, L., and Skomedal, H. (2021). "Bioactive peptides from microalgae: Focus on anti-cancer and immunomodulating activity." *Physiologia Plantarum*, Vol. 173, No. 2, pp. 612–623.

Soni, R. A., Sudhakar, K., and Rana, R. S. (2017). "*Spirulina* – From growth to nutritional product: A review." *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 69, pp. 157–171.

Souza, T. S., Andrade, C. J. de, Koblitiz, M. G. B., and Fai, A. E. C. (2023). "Microbial Peptidase in Food Processing : Current State of the Art and Future Trends." *Catalysis Letters*, Vol. 153, pp. 114–137.

Sridhar, K., Inbaraj, B. S., and Chen, B. (2021). "Recent developments on production , purification and biological activity of marine peptides." *Food Research International Journal*, Vol. 147, pp. 1-18.

Sun, L., Wang, L., and Zhou, Y. (2012). "Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*." *Carbohydrate Polymers*, Vol. 87, No. 2, pp. 1206–1210.

Sun, Y., Chang, R., Li, Q., and Li, B. (2016). "Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*." European Food Research and Technology, Vol. 242, No. 5, pp. 685–692.

Tavano, O. L. (2013). "Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 90, pp. 1–11.

Ünal, M. Ü., Şener, A., and Cemek, K. (2018). "Biyoaktif peptitlerin sağlık üzerine etkileri." Gıda, Vol. 43, No. 6, pp. 930–942.

Unger, T. (2002). "The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease." The American Journal of Cardiology, Vol. 89, No. 2, pp. 3–9.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. (1998). "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products." Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 46, No. 10, pp. 4113–4117.

Vercruysse, L., Smagghe, G., Beckers, T., and Camp, J. Van. (2009). "Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*." Food Chemistry, Vol. 114, No. 1, pp. 38–43.

Villaró, S., Jiménez-Márquez, S., Musari, E., Bermejo, R., and Lafarga, T. (2023). "Production of enzymatic hydrolysates with in vitro antioxidant, antihypertensive, and antidiabetic properties from proteins derived from *Arthrospira platensis*." Food Research International, Vol. 163, pp. 1-9.

Vo, T. S., Ryu, B., and Kim, S. K. (2013). "Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*." Journal of Functional Foods, Vol. 5, No. 3, pp. 1336–1346.

Vonshak, A. (Ed.). (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell biology and Biotechnology*. London, Great Britain: Taylor and Francis Ltd.

Wang, K., Luo, Q., Hong, H., Liu, H., and Luo, Y. (2021). "Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion." Food Research International, Vol. 139, pp. 1-11.

Wang, Y. K., He, H.-L., Chen, X.-L., Sun, C.-Y., Zhang, Y.-Z., and Zhou, B.-C. (2008). "Production of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides by fermentation of marine shrimp *Acetes chinensis* with *Lactobacillus fermentum* SM 605." *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 79, No. 5, pp. 785–791.

Wang, Y., Tibbetts, S. M., and McGinn, P. J. (2021). "Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements." *Foods*, Vol. 10, No. 12, pp. 1–18.

Wang, Z., and Zhang, X. (2016). "Inhibitory effects of small molecular peptides from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on cancer cell growth." *Food and Function*, Vol. 7, No. 2, pp. 781–788.

Wilson, J., Hayes, M., and Carney, B. (2011). "Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products." *Food Chemistry*, Vol. 129, No. 2, pp. 235–244.

Wu, J., and Ding, X. (2002). "Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides." *Food Research International*, Vol. 35, No. 4, pp. 367–375.

Zhang, B., and Zhang, X. (2013). "Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*." *Biotechnology Progress*, Vol. 29, No. 5, pp. 1230–1238.

Zhang, N., Li, F., Zhang, T., Li, C.-Y., Zhu, L., and Yan, S. (2022). "Isolation, identification, and molecular docking analysis of novel ACE inhibitory peptides from *Spirulina platensis*." *European Food Research and Technology*, Vol. 248, No. 4, pp. 1107–1115.

Zouari, N., Abid, M., Fakhfakh, N., Ayadi, M. A., Zorgui, L., Ayadi, M., and Attia, H. (2011). "Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation." *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 62, No. 8, pp. 811–813.

EKLER

EK - *S. platensis* Protein Hidrolizatlarının LCMS-MS Kromatogramları

