



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**DENİZ SALYANGOZU'NDAN (*Patella vulgata*) ENZİMATİK
OLARAK ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ
BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Gürkan BİLİR

Danışman
Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

SAMSUN
2023

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI



**DENİZ SALYANGOZU'NDAN (*Patella vulgata*) ENZİMATİK
OLARAK ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ
BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Gürkan BİLİR

Danışman
Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Gürkan BİLİR tarafından, Prof. Dr. Deniz EKİNCİ danışmanlığında hazırlanan “DENİZ SALYANGOZU’NDAN (*Patella vulgata*) ENZİMATİK OLARAK ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 18.5.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Rektörlük	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Deniz EKİNCİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Hakan ARSLAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Levent MERCAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

17 / 04 / 2023

Gürkan BİLİR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : DENİZ SALYANGOZU'NDAN (*Patella vulgata*) ENZİMATİK OLARAK ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 17/04/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 10

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

17/04/2023

Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

ÖZET

DENİZ SALYANGOZU'NDAN (*Patella vulgata*) ENZİMATİK OLARAK ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Gürkan BİLİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Mayıs/2023

Danışman: Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

Bu tez çalışmasında limpet olarak adlandırılan bir deniz salyangozu türünden (*Patella vulgata*) total protein ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve protein hidrolizatlarının oluşturulması amaçlanmıştır. Limpet protein konsantresinin fizikokimyasal özellikleri ve sindirilebilirliğinin yanı sıra *in vitro* gastrointestinal sindirimini (INFOGEST) takiben elde edilen hidrolizatların anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. İncelenen tüm sindirilmiş hidrolizatlar aktivite açısından limpet protein konsantresinden daha iyi performans göstermiştir. Gastrointestinal sindirimden sonra LC-MS/MS ile elde edilen veriler ile bir veritabanı araması ve *de novo* yaklaşımı kullanılarak gastrik sindirim ve gastrointestinal sindirim hidrolizatlarında sırasıyla toplam 7 ve 6 peptit tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitlerin çoğunun antioksidan ve ACE inhibitör aktivitelerine katkıda bulunabilecek hidrofobik ve aromatik amino asit dizilerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında, Alkalaz ve Flavourzyme gibi ticari gıda sınıfı proteazlar kullanılarak limpet protein konsantresinden farklı biyoaktif protein hidrolizatlarının üretilmesi ve karakterizasyonu da gerçekleştirilmiştir. Bu enzimlerle üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibisyonu ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra dipeptidil peptidaz IV'e (DPP-IV) karşı inhibisyon etkisi de araştırılmıştır. Genel olarak, limpet protein konsantresinden Alkalaz ile oluşturulan hidrolizatlar, Flavourzyme ile oluşturulan hidrolizatlara kıyasla daha yüksek *in vitro* aktivite göstermiştir. Bu çalışmanın bulguları, limpet protein konsantresinin bir dizi şifrelenmiş biyoaktif peptit dizisi içeren insan tüketimi için iyi sindirilebilirlik ile yüksek besin kalitesine sahip olduğunu göstermiştir. Gastrointestinal sindirimi takiben elde edilen hidrolizatların potansiyel bir antioksidatif ve ACE inhibitör peptit kaynağı olarak hizmet edebileceğini ve ayrıca Alkalaz ile üretilen limpet protein hidrolizatlarının, yeni antioksidanların yanı sıra Tip-2 diyabet ve hipertansiyon hastalıklarıyla ilişkili ACE ve DPP-IV inhibitörlerinin geliştirilmesi için umut verici bir biyoaktif peptit kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: *Patella vulgata*, Limpet, PDCAAS, Hidrolizat, Peptit, ACE inhibitörü, DPP-IV inhibitörü, Antioksidan, *İn vitro* biyoaktivite, Sindirilebilirlik

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEIN HYDROLYSATES ENZYMATICALLY OBTAINED FROM LIMPET (*Patella vulgata*)

Gürkan BİLİR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Ph.D., May/2023

Supervisor: Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

In this thesis study, it was aimed to extract and characterize total protein from a sea snail species called limpet (*Patella vulgata*) and to prepare protein hydrolysates. The physicochemical properties and digestibility of limpet protein concentrate, as well as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition and antioxidant activities of hydrolysates obtained following *in vitro* gastrointestinal digestion (INFOGEST) were assessed. All digested hydrolysates examined outperformed limpet protein concentrate in terms of activity. A total of 7 and 6 peptides were identified in gastric digestion and gastrointestinal digestion hydrolysates, respectively, using a database search and *de novo* approach with data obtained by LC-MS/MS after gastrointestinal digestion. Most of the identified peptides were found to possess hydrophobic and aromatic amino acid sequences that may contribute to their antioxidant and ACE inhibitory activities. In this thesis, the production and characterization of different bioactive protein hydrolysates from limpet protein concentrate using commercial food-grade proteases such as Alcalase and Flavourzyme were also carried out. In addition to ACE inhibition and antioxidant activities of protein hydrolysates produced with these enzymes, the inhibition effect against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) was also investigated. In general, hydrolysates generated with Alcalase from limpet protein concentrate showed higher *in vitro* activity compared to hydrolysates generated with Flavourzyme. The findings of this study showed that limpet protein concentrate has high nutritional quality with good digestibility for human consumption containing a series of encoded bioactive peptide sequences. The findings indicated that hydrolysates obtained following gastrointestinal digestion could serve as a potential source of antioxidative and ACE inhibitory peptides. Furthermore, these findings indicated that limpet protein hydrolysates produced with Alcalase could be a promising source of bioactive peptides for the development of novel antioxidants as well as ACE and DPP-IV inhibitors associated with Type-2 diabetes and hypertension diseases.

Keywords: *Patella vulgata*, Limpet, PDCAAS, Hydrolysate, Peptide, ACE inhibitor, DPP-IV inhibitor, Antioxidant, *In vitro* bioactivity, Digestibility

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve akademik hayatım boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen ve akademik hayatımda bana yol gösterici olan akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Deniz EKİNCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tez çalışmama yaptıkları katkı ve yardımları için Tez İzleme Komitesi Üyesi Sayın hocam Prof. Dr. Hakan ARSLAN'a ve Doç. Dr. Levent MERCAN'a teşekkür ederim. Tez içeriğinin geliştirilmesi ve zenginleştirilmesine yönelik değerli görüş ve önerilerinden dolayı tez savunma jürisinde yer alan Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tüm aileme en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Doktora tez çalışmalarım ile ilgili olarak 2022 yılında İrlanda'daki Limerick Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Fakültesi, Doğa Bilimleri Okulu, Biyolojik Bilimler Bölümünde yaptığım araştırmalarımı "2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı" ile desteklediği için her daim bilim ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

I would like to acknowledge the outstanding support and guidance of Professor Richard J. FitzGerald during the course of this PhD thesis, as well as Dr Maria Cermeño, Dr Mohammadreza Khalesi, Dr Thanyaporn Kleekayai, Dr Miryam Amigo-Benavent and Dr Neda Khatib, all of whom gave me the time, the strength, courage and independence to develop as a researcher during my laboratory work.

Gürkan BİLİR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	8
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Protein Kaynağı Olarak Kullanılan Deniz Salyangozu	9
2.2. Protein İzolasyon Yöntemleri	10
2.3. Proteinlerin Hidrolizi	12
2.4. Hidroliz Derecesi	13
2.5. Protein Hidrolizatlarının Elde Edilme Yöntemleri	14
2.5.1. Kimyasal Hidroliz	15
2.5.2. Mikrobiyal Fermentasyon	16
2.5.3. Enzimatik Hidroliz	17
2.6. Deniz Yumuşakçalarının Sindirilebilirliği ve Biyoyararlanımları	21
2.7. Deniz Yumuşakçalarının Biyolojik Aktiviteleri	24
2.7.1. Antioksidan Aktivite	24
2.7.2. Antihipertansif Aktivite	26
2.7.3. Antidiyabetik Aktivite	28
2.8. Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu ve Tanımlanması	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Materyal	32
3.2. Limpet Homojenatının Hazırlanması	32
3.3. Limpet Homojenatının Azot Çözünürlük Profili	33
3.4. Limpet Protein Konsantrasyonunun Hazırlanması	34
3.5. Besin Bileşimi Analizleri	34
3.6. Protein Sindirilebilirliği ve Düzeltilmiş Amino Asit Skoru (PDCAAS) Belirleme....	35
3.6.1. Amin İçeriğinin Belirlenmesi.....	35
3.6.2. Amino Asit Analizi	36
3.6.3. PDCAAS'ın hesaplanması	36
3.7. Protein Hidrolizatlarının Oluşturulması	36
3.7.1. Enzimatik Hidroliz.....	36
3.7.2. INFOGEST Yöntemi Kullanılarak <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sindirim.....	37
3.8. Hidroliz Derecesinin Ölçülmesi.....	38
3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	38
3.10. Jel Geçirgenlik-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	39
3.11. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)	39
3.12. Biyoaktivite Analizleri	39
3.12.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesinin Belirlenmesi.....	39
3.12.2. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) (ABTS ⁺) Radikal İndirgeme Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.12.3. Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.12.4. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitör Aktivitesinin Belirlenmesi.....	41
3.12.5. Dipeptidil peptidaz (DPP)-IV inhibitör aktivitesi	41
3.13. LC-MS/MS ile Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi	42
3.14. İstatistiksel Analiz.....	42

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Limpet Homojenatının Besin Bileşimi	43
4.2. Limpet Protein Konsantresinin Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu.....	44
4.2.1. Azot Çözünürlüğü.....	44
4.2.2. Limpet Protein Konsantresinin AA Bileşimi ve PDCAAS.....	46
4.2.3. Limpet Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi.....	48
4.2.4. SDS-PAGE Profili	50
4.2.5. Limpet Protein Hidrolizatlarının Moleküler Kütle Dağılımı	52
4.3. Limpet Protein Hidrolizatlarının <i>in vitro</i> Biyolojik Aktiviteleri.....	55
4.3.1. Enzimatik Protein Hidrolizatları	55
4.3.2. <i>In vitro</i> Gastrointestinal Sindirim Hidrolizatları.....	60
4.4. LC-MS/MS ile Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	69
ÖZ GEÇMİŞ.....	83



SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Amino asit
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACN	: Asetonitril
DPP-IV	: Dipeptidil peptitaz-IV
EAA	: Esansiyel amino asit
FRAP	: Demir iyonu indirgeme gücü
GP-HPLC	: Jel geçirgenlik-yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HD	: Hidroliz derecesi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LPK	: Limpet protein konsantresi
NPN	: Protein olmayan azot
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
PAGE	: Polakrilamid jel elektroforezi
PDCAAS	: Protein sindirilebilirliği düzeltilmiş amino asit skoru
PN	: Protein azotu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TFA	: Trifloroasetik asit
TN	: Toplam azot
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
UPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Patellidae familyasının genel morfolojik ve anatomik yapısı.....	9
Şekil 3.1. Limpetlerin toplandığı konum	32
Şekil 3.2. Limpet homojenatının hazırlanması	33
Şekil 4.1. Limpet homojenatının azot çözünürlük profili	45
Şekil 4.2. Alkalaz ve Flavourzyme ile elde edilen limpet protein hidrolizatlarının hidrolizi	48
Şekil 4.3. <i>İn vitro</i> gastrik ve gastrointestinal sindirimin ardından elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri.....	49
Şekil 4.4. Limpet protein konsantresinin ve INFOGEST sindirimini takiben karşılık gelen hidrolizatların SDS-PAGE profilleri.....	50
Şekil 4.5. Alkalaz (A) ve Flavourzyme (B) enzimleri ile elde edilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri	51
Şekil 4.6. Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri elde edilen limpet protein hidrolizatlarının moleküler kütle dağılım profilleri	53
Şekil 4.7. Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri ile elde edilen limpet proteinlerinin hidrolizatlarının RP-HLPC profilleri	53
Şekil 4.8. Limpet protein konsantresi, gastrik ve gastrointestinal sindirim hidrolizatlarının moleküler kütle dağılımları	54
Şekil 4.9. Alkalaz ve Flavourzyme ile elde edilen limpet protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri.....	57
Şekil 4.10. Alkalaz ve Flavourzyme ile oluşturulan limpet protein hidrolizatlarının <i>in vitro</i> anjiyotensin-I-dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu	59
Şekil 4.11. Alkalaz ve Flavourzyme ile oluşturulan limpet protein hidrolizatlarının <i>in vitro</i> dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) inhibisyonu	59
Şekil 4.12. <i>İn vitro</i> gastrointestinal sindirim hidrolizatlarının (A) ORAC deneyi, (B) ABTS radikal indirgeme deneyi, (C) FRAP ve (D) ACE inhibisyonu kullanılarak biyolojik aktiviteleri.....	61
Şekil 4.13. <i>İn vitro</i> gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatlarda tanımlanan peptitlerin Uniprot veri tabanı yaklaşımı kullanılarak Venn diyagramı (A) ve dev baykuş limpetinden elde edilen aktinin peptit kapsamını temsil eden peptigram (B)	64

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.1. Yumuşakçalar elde edilen protein hidrolizatları ve peptitlerle ilişkili biyolojik aktiviteler.....	6
Tablo 4.1. Limpet eti, homojenat ve limpet protein konsantresinin temel besin bileşimi.....	43
Tablo 4.2. Limpet protein konsantresinin toplam amino asit bileşimi.....	46
Tablo 4.3. 2-5 yaş arası bir çocuğun amino asit gereksinimleri ile karşılaştırıldığında LPK'nın EAA bileşimi	47
Tablo 4.4. <i>İn vitro</i> gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatların sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile Uniprot veri tabanı kullanılarak peptitlerin tanımlanması.....	63
Tablo 4.5. <i>İn vitro</i> gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatların sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile <i>de novo</i> yaklaşım kullanılarak peptitlerin tanımlanması	65

1. GİRİŞ

Büyük bir biyoçeşitliliğe sahip olan su ekosistemi, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrileri için potansiyel olarak ekonomik değere sahip besinler ve biyolojik olarak aktif bileşikler içeren milyonlarca türden oluşan sınırsız bir kaynaktır. Denizlerde keşfedilmemiş biyoteknoloji fırsatlarını değerlendirmek ve hakkında daha fazla bilgi edinmek için kapsamlı araştırmalar yürütülmektedir (Ucak vd., 2021).

Toplam küresel balık ve kabuklu deniz ürünleri üretimi son yıllarda artarak 2019'da yaklaşık 177.8 milyon tona ulaşmıştır. Bu değer, yabani avlanma ve su ürünleri yetiştiriciliği arasında bölünerek 92.5 milyon tonu yabani avlanmadan, geriye kalanı ise su ürünleri üretiminden kaynaklanmıştır. Su ürünleri üretimi, 2002'de 36.8 milyon ton iken istikrarlı bir şekilde artarak 2019'da 85.3 milyon tona ulaşmıştır ve tahmini değerinin 260 milyar ABD doları olduğu bildirilmiştir. FAO (2021) verilerine göre, 2019 yılında toplam dünya su ürünleri yetiştiriciliği üretiminin %66'sını balık türleri oluşturmaktadır, bu üretimin %20.6'sı yumuşakçalardan (17.6 milyon ton), %12.3'ü kabuklu deniz organizmalarından (10.5 milyon ton) ve %1.1'i ise diğer su hayvanı türlerinden (977 bin ton) oluşmaktadır. Toplam su ürünleri üretiminin %89'unun insan tüketimine ayrıldığı, geriye kalan %11'inin ise balık unu ve balık yağı gibi diğer ürünlere ayrıldığı tahmin edilmektedir (FAO, 2021).

Bollukları ve çeşitlilikleri sayesinde deniz organizmaları, gelişen gıda ve ilaç endüstrileri için hayati bir tedarik kaynağı oluşturmaktadır (Khan ve Liu, 2019). Deniz ortamı, dünya yüzey alanının %70'ini oluşturur ve buradaki biyolojik çeşitliliğin, birçok araştırmacı tarafından tropikal yağmur ormanlarından bile daha büyük olduğu değerlendirilmektedir (Ebada vd., 2008). Deniz organizmaları, besin değerleri ve fonksiyonel gıda ve nutrasötikler endüstrisindeki potansiyel rolleri nedeniyle bilim insanları tarafından büyük ilgi gören önemli bir besin kaynağıdır. Deniz organizmalarından izole edilen birçok ürünün sağlığı geliştirici etkileri, başarılı klinik denemelerin ardından kanıtlanmıştır (Khan ve Liu, 2019). Muhtemelen, yumuşakçalar bu açıdan en dikkate değer deniz organizmaları grubudur. Çünkü tüm hayvanların %7'sini oluşturan yumuşakçalar, yaklaşık 200.000 türden oluştuğu tahmin edilen en yaygın ikinci hayvan şubesi olarak kabul edilir ve 52.000'den fazla deniz yumuşakçası türü tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Benkendorff, 2010; Santhanam, 2018). Vücutları ayaklara ve iç organlara bölünmüş sekiz yumuşak gövdeli omurgasız sınıfından çift kabuklular (istiridye, midye ve deniz tarağı), kafadanbacaklılar

(ahtapot, kalamar ve mürekkep balığı) ve gastropodlar (deniz salyangozları, limpet, denizkulağı ve kum midyesi) ekonomik açıdan önemli yumuşakçaları temsil eder (Venugopal ve Gopakumar, 2017). Bu üç gruptan çift kabuklular ve gastropodlar, doğal ürün keşfi ile ilgili olarak en çok araştırılan yumuşakçaları oluşturur ve toplam yumuşakça türlerinin yaklaşık %98'ini oluşturur (Avila, 2006).

Ekonomik açıdan önemli birçok yumuşakçanın ticari olarak üretilmesi ve yetiştirilmesi, yüksek besin değeri ve bununla bağlantılı sağlık yararları nedeniyle olağandır. Bollukları ve yakalanıp yetiştirilme kolaylıkları, onları nutrasötikler, fonksiyonel gıdalar ve gıda takviyeleri için bir dizi endüstriyel işleme için uygun bir aday haline getirmiştir (Khan ve Liu, 2019). Deniz yumuşakçalarının tüketimi yaygınlaşmaktadır ve haklı olarak “doğal fonksiyonel gıdalar” olarak kabul edilmiştir (Suleria vd., 2015). Örneğin, fermente mavi midye ve istiridye soslarından elde edilen biyoaktif peptitler hipertansiyonu önemli ölçüde azalttığı (Je, Park, Jung, vd., 2005; Je, Park, Byun, vd., 2005; Wijesekara ve Kim, 2010), öğütülmüş denizkulağı ve onun kabukları göz hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Kim ve Pallela, 2012).

Dünya yüzeyinin neredeyse dörtte üçünü oluşturan deniz ortamı ve toplam küresel biyoçeşitliliğin yaklaşık yarısını oluşturan deniz organizmaları çeşitli biyofonksiyonel bileşenlerin zengin kaynaklarıdır. Özellikle, bu biyoaktif bileşiklerin bazıları azotlu bileşenleri (protein, peptitler ve aminoasitler) içerir. Ayrıca deniz organizmalarında bugüne kadar çeşitli biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda bu azotlu bileşenler tanımlanmıştır. Deniz organizmaları proteinden türetilmiş biyoaktif peptitlerin üretimi için iyi bir aday hammaddeyi temsil eden önemli miktarlarda yüksek kaliteli protein (%10-47 (w/w)) içermektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2012, 2013a).

Yumuşakçaların ve kabuklu deniz canlılarının protein içeriği genellikle %7 ile %23 (w/w) arasında türlere göre değişmektedir (Murray ve Burt, 2001). Örneğin; karides %17-22, deniztarağı %12-20, kalamar %15-18, yengeç %18-22, ıstakoz %16-26, kril %12-15 ve midye ve istiridye %6-18 oranında protein içermektedir (Tahergorabi ve Jaczynski, 2016). Miyofibriller, sarkoplazmik ve stroma proteinleri, deniz organizmaları kas proteinlerinin üç ana grubudur. Genel olarak, miyofibriller proteinler (yapısal proteinler) deniz organizmaları kaslarındaki toplam proteinin %65-75'ini (w/w) oluşturur (Venugopal, 2009). Yüksek tuzda çözünebilen bu proteinler,

temel olarak miyozin, aktin, tropomiyosin, m-protein, alfa-aktin, beta-aktin, c-protein ve troponin T, I ve C'den oluşur ve bunların %65-78'ini (w/w) miyozin ve aktin oluşturur (Vareltzis, 2000). Ek olarak, omurgasız kası, omurgalı miyofibrillerinde bulunmayan bir protein olan paramiyosin içerir. Paramiyosin seviyesi, bir kabuklu deniz hayvanı miyofibrilinden diğerine önemli ölçüde değişebilir. Deniz tarağı, kalamar ve istiridye için %3–19 arasındaki değişen paramiyosin seviyeleri bildirilmiştir. Ayrıca paramiyosin, önemli miktarlarda glutamik asit, arjinin ve lizin ve düşük seviyelerde prolin içerir (Belitz vd., 2004; Venugopal, 2009). Sarkoplazmik (suda veya düşük tuzlu tamponda çözünen) proteinler, toplam kas proteininin yaklaşık %15-35'ini (w/w) oluşturmaktadır. Genel olarak, bu protein fraksiyonu esas olarak miyoglobin, hemoglobin, sitokrom proteinleri ve çok çeşitli endojen enzimlerden oluşmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012, 2013a). Bununla birlikte, her bir proteinin seviyesi türler arasında önemli ölçüde değişebilir. Örneğin bazı yumuşakçalar hemoglobin içermediği ve dahası, balık ve memeli kaynaklı sarkoplazmik proteinler arasında kompozisyon farklılıkları bildirilmiştir (Belitz vd., 2004). Balık miyoglobininin sistein içerdiği ancak memeli eşdeğerinde bu rezidünün olmadığı rapor edilmiştir. Stroma veya bağ dokusu proteinleri esas olarak kolajen ve elastinden oluşmaktadır. Genel olarak, kas proteinleri yaklaşık %3 (w/w) stroma proteinlerini içermektedir. Bununla birlikte bazı deniz organizmalarında, stroma proteinleri toplam kas proteininin %10'unu (w/w) oluşturabilmektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2012, 2013a).

Deniz ürünlerinin kas proteinleri dahil tüm proteinler, uzun ve yapısal olarak karmaşık bir biyomolekül halinde birbirine bağlanmış aminoasit (AA) zincirleridir (Tahergorabi ve Jaczynski, 2016). Proteinler, insan vücudundaki temel fizyolojik ve biyolojik işlevleri düzenlemek için kullanılan temel bileşenlerinden biridir. Gıda proteinleri, tüketildikten sonra proteaz enzimleri tarafından gastrointestinal sindirim sırasında daha küçük peptitlere ve amino asitlere parçalanmaktadır (Jeon ve Samarakoon, 2013). Bu nedenle, protein kalitesi büyük ölçüde amino asit içeriğine ve sindirilebilirliğine bağlıdır. Amino asitler, hücre ve organların büyümesi, bakımı ve metabolik aktivitesi için birçok biyokimyasal yolağa katılır ve gereksinimleri yaşamın evresine bağlı olarak değişmektedir (Aristoy ve Toldrá, 2004). Doğal olarak oluşan yaklaşık 20 AA vardır ve bunlardan 9'u esansiyel aminoasittir. Esansiyel aminoasitler insan beslenmesinde özellikle önemlidir çünkü insanlar onları *de novo* sentezlemek

için fizyolojik bir yeteneğe (biyokimyasal yolak) sahip değildir. Bu nedenle, esansiyel aminoasitleri insanlara sağlamanın tek yolu yeterli ve dengeli besin alımından geçmektedir. İnsanlarda etkili protein sentezi için dokuz esansiyel aminoasit tümü gereklidir. Eğer besin herhangi bir esansiyel aminoasitten yetersiz ise, protein sentezinin genel oranı en az bulunan esansiyel aminoasitler ile sınırlanacaktır. Protein sentezini sınırlayan esansiyel aminoasite, insanlarda protein sentezinin tam hızıyla ilerlemesine izin vermemesinden dolayı sınırlayıcı esansiyel aminoasit denir (Tahergorabi ve Jaczynski, 2016). Böylece, bir proteindeki amino asit profili ve sınırlayıcı amino asitlerin bilinmesi, yalnızca o proteinin kalitesini kontrol etmek için değil, aynı zamanda gerekli amino asitlerle takviye ederek beslenme kalitesini iyileştirmek için de çok önemlidir. Belirli bir proteinin, yiyeceğin veya diyetin amino asit bileşimi hakkında iyi bir bilgi elde etmek için amino asit analizinin önemi açıktır. Ayrıca, sınırlayıcı bir amino asidin bilgisi, temel gıdalarda, yaşlılar veya bebekler gibi özel beslenme ihtiyaçları olan popülasyonlar için gıdalar tasarlarırken de çok önemli olduğu bildirilmiştir (Aristoy ve Toldrá, 2004). Genellikle gıda sistemlerinde sınırlayıcı oldukları bildirilen lizin ve metiyonin esansiyel aminoasitleri özellikle deniz ürünleri proteinlerinde yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Ahn ve Kim, 2013; Tahergorabi ve Jaczynski, 2016). Kabuklu deniz organizmaları, balıklarla karşılaştırıldığında yüksek amino asit içeriğine sahiptir (Venugopal ve Gopakumar, 2017). Örneğin, istiridye (*Meretrix lusoria*), midye (*Mytilus coruscus*) ve deniz salyangozunun (*Hexaplex trunculus*) yenilebilir kısımlarının, lösin, lizin, treonin ve fenilalanin başta olmak üzere esansiyel amino asit kaynakları olduğu bildirilmiştir (Karnjanapratum vd., 2013; Li vd., 2010; Zarai vd., 2011). Ayrıca, karides, ıstakoz, yengeç, kalamar ve diğer deniz organizmaları genellikle balıklardan daha fazla miktarda arjinin, glutamik asit, glisin ve alanin içermektedir (Tahergorabi ve Jaczynski, 2016).

Proteinler, büyüme ve normal vücut fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli enerji ve amino asitleri sağladıkları için önemli bir makro besin maddesidir. Proteinlerin birçok fizyolojik ve işlevsel özelliği biyoaktif peptitlere atfedilmektedir. Gıda proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitler, sağlık artırıcı özelliklerinin farkındalığı nedeniyle giderek daha cazip hale gelmektedir. Birçok doğal ve işlenmiş gıdadan elde edilen biyoaktif peptitler artık izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bağırsak sindirimi sırasında metabolizma sürecinde potansiyel fizyolojik modülatörler

olarak işlev görürler ve yapılarına, bileşimlerine ve amino asit dizilimlerine bağlı olarak serbest bırakılırlar. Bazı biyoaktif peptitlerin nutrasötik potansiyele sahip olduğu ve hipertansiyon gibi durumların tedavisinde aday olarak kullanılma potansiyeli ile genel insan sağlığını desteklediği bildirilmiştir (Pujiastuti vd., 2019). Diyet proteinlerinin vücuttaki fizyolojik parametreleri etkileyebilen peptit dizileri içerdiği gösterilmiştir. Değiştirilen parametrelerden bazıları kan basıncı, insülin ve glukoz homeostazi, kan kolesterol seviyesi ve bağışıklık fonksiyonudur (Harnedy ve FitzGerald, 2013a). Genellikle, biyoaktif peptitler, ana proteinlerin yapısı içinde inaktif bir durumda şifrelenmiştir. Bu tür peptitler, *in vitro* enzimatik hidroliz, gastrointestinal sindirim ve gıda işleme (örneğin fermentasyon) yoluyla elde edilebilen ana proteinlerden serbest bırakıldıktan sonra aktif hale gelir (Chai vd., 2017; Harnedy ve FitzGerald, 2013a). Optimal koşullar altında enzimatik hidroliz, deniz kökenli proteinler de dahil olmak üzere gıda proteinlerinden antioksidan ve diğer biyoaktif peptitlerin serbest bırakılması için en etkili ve güvenilir stratejidir (Chai vd., 2017). Aynı zamanda gıda ve ilaç endüstrilerinde biyoaktif peptit üretimi için tercih edilen bir yöntemdir (Kim ve Wijesekara, 2010). Peptitler, amino asit içerikleri, amino asit dizilimleri ve yapısal özellikleri nedeniyle antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif, antikanser, antiviral, antitrombotik, hipokolesterolemik ve immün-modülatör gibi insan sağlığı üzerinde etkisi olan çeşitli biyolojik aktiviteler sunmaktadır (Borrajó vd., 2019; Helkar vd., 2016; Lemes vd., 2016; Mullen vd., 2017). Ayrıca, gıda maddelerinde doğal koruyucu olarak ve fonksiyonel gıdalarda faydalı bileşenler olarak kullanılabildiği bildirilmiştir (Di Bernardini vd., 2011). Deniz organizmalarından elde edilen proteinler bitki, hayvan veya mikrobiyal kaynaklardan alınan proteolitik enzimlerle yüksek düzeyde kontrollü bir ortamda hidrolizi sonucunda, potansiyel biyofonksiyonel özelliklere sahip bir dizi peptit üretme kapasitesine sahiptir. Bugüne kadar, deniz organizması protein hidrolizatları esas olarak düşük değerli hayvan yemlerinin, su kültürü (balık ve kabuklu deniz ürünleri) yemlerinin, tatlandırıcıların ve besin takviyesi için bileşenlerin üretiminde kullanılmıştır (Neves vd., 2016b). Tablo 1.1. yumuşakçaları protein kaynağı olarak kullanıp bugüne kadar tanımlanan farklı biyoaktif hidrolizatları ve peptitleri göstermektedir. Yumuşakçalardan türetilen bazı hidrolizatlar ve peptitler, antioksidan, antidiyabetik, antihipertansif, antimikrobiyal, antikoagülant ve iltihaplanmayı önleyici gibi aktiviteler göstermiştir.

Tablo 1.1. Yumuşakçalar elde edilen protein hidrolizatları ve peptitlerle ilişkili biyolojik aktiviteler

Tür ismi	Enzim(ler)	Peptit dizisi/tanımı	Biyoaktif özelliği	Kaynak
Deniz hıyarı (<i>Acaudina molpadioidea</i>)	Bromelain TM ve Alkalaz TM	MEGAQEAQGD	Antihipertansif	(Zhao vd., 2009)
İstiridye (<i>Crassostrea gigas</i>)	Protameks TM	QCQCAVEGGL	Antienflamatuvar	(Hwang vd., 2012)
	Papain	DFEEIPEEYLQ	Antikoagülan	(Cheng vd., 2018)
	Tripsin	B-Timosin	Antimikrobiyal	(Nam vd., 2015)
	Pepsin, Tripsin and α -kimotripsin	LKQELEDLLEKQE	Antioksidan	(Qian vd., 2008)
İstiridye (<i>Crassostrea madrasensis</i>)	Papain	ISIGGQPAGRIVM	Antioksidan	(K. K. Asha vd., 2016)
İstiridye (<i>Crassostrea talienwhanensis</i>)	Alkalaz	PVMGA, QHGV	Antioksidan	(Wang vd., 2014)
Tatlı su midyesi (<i>Corbicula fluminea</i>)	Protameks TM ve Flavourzyme TM	VKP ve VKK	Antihipertansif	(Tsai vd., 2006)
Dev kalamar (<i>Dosidicus gigas</i>)	Alkalaz TM	GPLGLLGFLGPLGLS	Antioksidan	(Alemán vd., 2011)
	Tripsin	FDSGPAGVL, NGPLQAGQPGER	Antioksidan	(Mendis vd., 2005)
	Tripsin	NADFGLNGLEGLA, NGLEGLK	Antioksidan	(Rajapakse vd., 2005)
Denizkulağı (<i>Haliotis discus</i>)	Pepsin, tripsin, α -kimotripsin	PFNQGTAS	Antihipertansif, Antialerjik	(Ko vd., 2016)
Hint kalamarı (<i>Loligo duvauceli</i>)	α -chymotripsin	WCTSVS	Antioksidan	(Sudhakar ve Nazeer, 2015)
Sert istiridye (<i>Meretrix lusoria</i>)	Protameks TM	VRK, YN	Antihipertansif	(Tsai vd., 2008)

Tablo 1.1. (devam)

Tür ismi	Enzim(ler)	Peptit dizisi/tanımı	Biyoaktif özelliği	Kaynak
Sert kabuklu midye (<i>Mytilus coruscus</i>)	Pepsin	AFNIHNRNLL	Antikanser	(Kim vd., 2012)
	Alkalaz TM , Flavourzyme TM , Nötraz TM , α -kimotripsin, Papain, pepsin, tripsin	GVSLQQLFL	Antienflamatuvar	(Kim, Kim, vd., 2013)
	Tripsin	SDHQMAQSACMGLAQDAAYASAI	Antimikrobiyal	(Oh vd., 2020)
	Pepsin, tripsin, α -kimotripsin	LVGDEQAVPAVCVP	Antioksidan	(Jung vd., 2007)
Mavi midye (<i>Mytilus edulis</i>)	Pepsin	PIIVYWK, TTANIEDRR, FSVVPSPK	Antioksidan	(Park vd., 2016)
	Neutrase TM	YPPAK	Antioksidan	(Wang vd., 2013)
	Alkalaz TM , Flavourzyme TM , Corolase PP TM ve Promod 144MG TM	Protein hidrolizatı	Antihipertansif, Antidiyabetik, Antioksidan	(Neves vd., 2016a)
Kum midyesi (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	α -kimotripsin	SVEIQALCDM, AVLVDKQCPD	Antioksidan, Antikanser	(Kim, Hwang, vd., 2013)
	Alkalaz TM	QCQAVQSAV	Antienflamatuvar	(Lee vd., 2012)
Deniztarağı (<i>Patinopecten yessoensis</i>)	Nötraz TM	HMSY, PEASY	Antioksidan	(Wu vd., 2016)
Yeşil midye (<i>Perna canaliculus</i>)	Pepsin	Protein hidrolizatı	Antihipertansif, Antioksidan	(Jayaprakash ve Perera, 2020)
Kaya istiridyesi (<i>Saccostrea cucullata</i>)	<i>Bacillus cereus</i> SU12'den proteaz	LANAK	Antioksidan, Antikanser	(Umayaparvathi vd., 2014)
İnci istiridyesi (<i>Pinctada fucata</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 'den Nükleisin ve Orientaz TM	GVGSPY	Antihipertansif	(Sasaki vd., 2019)
Kan midyesi (<i>Tegillarca granosa</i>)	Nötraz TM	WPP	Antioksidan, Antikanser	(Chi vd., 2015)

1.1. Amaç

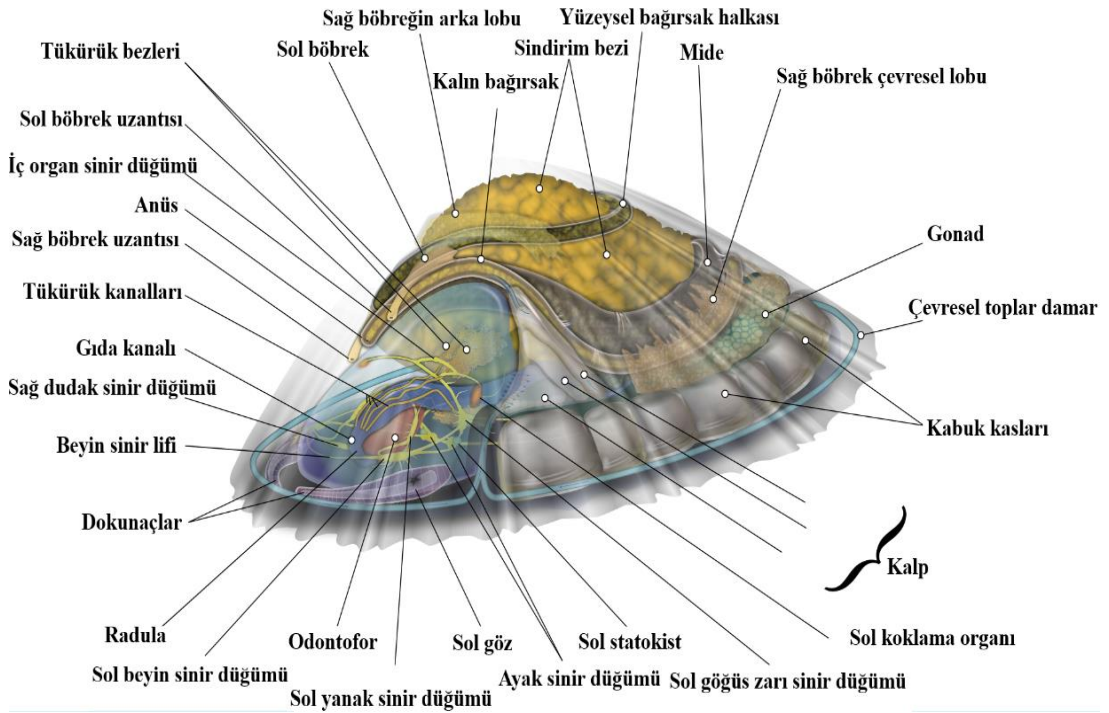
Dünya çapında yumuşakçalar ve kabuklu deniz canlıları da dahil olmak üzere birçok organizmada yapılan çalışmalarda yeni biyolojik olarak aktif bileşikler keşfedilmeye devam ederken, *Patella* türlerinden elde edilen protein hidrolizatların ve hidrolizatları oluşturan peptitlerin biyoaktif özelliklerinin yanı sıra potansiyel protein sindirilebilirliğine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasının amaçları;

- İrlanda'nın batı kıyısından toplanan limpetlerden (*P. vulgata*) proteinleri izole etmek ve limpet protein konsantresini fizikokimyasal özellikleri ve beslenme kalitesi (AA bileşimi ve protein sindirilebilirliği gibi) açısından karakterize etmek,
- Limpet protein konsantresinden enzimatik hidroliz ve *in vitro* gastrointestinal sindirim yöntemleri kullanılarak peptitlerden oluşan protein hidrolizatlarını elde etmek ve karakterize etmek,
- *In vitro* gastrointestinal sindirimin peptit profili üzerine etkisini değerlendirmek,
- Limpet protein konsantresi, hidrolizat ve peptitlerin *in vitro* biyoaktif (antioksidan, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibisyonu) özelliklerini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protein Kaynağı Olarak Kullanılan Deniz Salyangozu

Patella vulgata türü deniz salyangozu, yumuşakçalar şubesinden *Patella* (Gastropoda:Patellidae) cinsine aittir ve kuzey Avrupa kıyılarındaki gelgit topluluklarının önemli deniz organizmalarıdır (Firth vd., 2017; Reguera vd., 2018; Santini vd., 2019). Limpet olarak adlandırılan bu tür deniz salyangozları, deniz ortamında sarmal yapı göstermeyen kabuk morfolojileri ile kolayca ayırt edilebilen tek kabuklu/karındanbacaklı yumuşakçalardır (Şekil 2.1.). Kuzeydoğu Atlantik ve Akdeniz'de hemen hemen tüm kayalık sahil şeritlerinde dağılım gösteren *Patella* türleri, su içinde veya su serpintileriyle ıslanan taşlar üzerinde sıkıca tutunmuş olarak yaşamını sürdürürler. Deniz salyangozları dahil olmak üzere deniz yumuşakçaları, yüksek düzeyde protein (%10-47 (w/w)) ve düşük doymuş yağ asitleri oranı gibi besleyici özelliklere sahiptir ve birçok bölgede temel gıda olarak tüketilir (Fernandes vd., 2019; Weber ve Hawkins, 2002).



Şekil 2.1. Patellidae familyasının genel morfolojik ve anatomik yapısı (Ruppert vd., 2004)

Deniz salyangozları en sık gelgit boyunca kayalık kıyılarda bulunur ve kıyı topluluklarının yapısı ve işlevi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Örneğin, deniz salyangozları, birincil besin kaynakları oldukları için ekosistemdeki mikroalg

bolluğunu değiştirebilirler (Burgos-Rubio vd., 2015; McCarthy vd., 2008; Santini vd., 2019). *P. vulgata*, İrlanda kıyılarında bulunan ve limpet olarak adlandırılan iki deniz salyangozu türünden (*Patella ulyssiponensis* ile birlikte) biridir (Delany vd., 1998; McCarthy vd., 2008). *Patella* türleri, yüksek bollukları ve alçak gelgitler sırasında göreceli olarak toplama kolaylığı nedeniyle değerli deniz ürünleridir. Fakat bu tür deniz salyangozları yenilebilir yumuşakçalar olmasına rağmen, pişirildikten sonra doku (tekstür) yapısının sertliği nedeniyle tüketimi popöler değildir. *Patella* türlerinin dağılımları, bollukları, hareketsiz yaşam tarzları, bulunduğu ortamdaki kirleticilerin varlığı ve toksisitesinin değerlendirilmesiyle ilgili çalışmalar mevcuttur (Reguera vd., 2018). Ancak tez çalışmamızda protein kaynağı olarak kullandığımız *Patella vulgata*'nın biyokimyasal içeriği ve sahip olduğu potansiyel biyoaktif bileşik çeşitliliği hakkında çalışma bulunmamaktadır. Bu da tez çalışmamızın özgünlüğünü göstermektedir.

2.2. Protein İzolasyon Yöntemleri

Deniz organizmaları proteinlerini izole etmek için yıllar içinde çeşitli teknolojiler ve yöntemler geliştirilmiştir fakat bunların çoğu izole edilen proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin kaybına neden olmuştur (Surasani, 2018). Bu yöntemler, izolasyon sırasında ağırlık/hacim oranı, kullanılan ardışık ekstraksiyon sayısı, homojenizasyon, izolasyon pH'ı ve çalkalama süresi gibi parametrelerde farklılık göstermektedir.

Asit veya alkali çözünürleştirme ve çökeltme yöntemi ya da izoelektrik çözünürleştirme/çökeltme yöntemi olarak da adlandırılan pH-shift yöntemi bu tür organizmalardan proteinleri izole etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir ve patentlenmiştir (Gehring vd., 2011; Hultin ve Kelleher, 1999; Hultin ve Kelleher, 2000; Surasani, 2018). Bu yöntem, kas proteinlerinin suda farklı pH değerlerinde sergilediği çözünürlük farklılıklarına dayanmaktadır. İzoelektrik çökeltme yöntemi, proteinlerin asidik veya bazik çözelti kullanılarak çözündürölmesini ve ardından izoelektrik noktalarında (*pI*) çökertilmesini içermektedir (Gehring vd., 2011; Nolsøe ve Undeland, 2009). Balık unu veya diğer hidrolizat üretimi ile karşılaştırıldığında, son ürünün gıda ve nutrasötik uygulamaları için kullanılabilecek fonksiyonel proteinler içermesi avantajına sahiptir. Genel olarak, bir çözeltideki proteinler zayıf protein-protein etkileşimleri ile bir arada tutulur (Undeland vd., 2003) ve proteinlerin yan zincirleri çözeltinin pH'ındaki değişikliklerle farklı yükler alabilir. Protein

çözeltilisinin pH'ındaki bir artış veya azalma sırasında, yan zincirler güçlü pozitif veya negatif yükler üstlenebilir ve bu da proteinler arasında proteinleri birbirinden ayıran güçlü itici kuvvetlere neden olur. Bu güçlü pozitif veya negatif yükler protein-su etkileşimlerini destekleyecek ve böylece proteinlerin çözünürlüğüne neden olacaktır (Yasothai ve Giriprasad, 2015). Asit ilavesi, hidronyum iyonlarının (H_3O^+) eklenmesi yoluyla glutamil ve aspartil rezidülerinin yan zincirleri üzerindeki net pozitif yükü artırırken, alkali ilavesi hidroksil iyonlarının (OH^-) eklenmesi yoluyla tirozil, triptofenil, sisteinil, lizil, arjininil ve histidinil rezidülerinin yan zincirleri üzerindeki net negatif yükü artıracaktır (Tahergorabi ve ark. 2012). Aynı şekilde, balık proteinleri asidik pH'da aspartil ve glutamil rezidüleri üzerindeki pozitif yükler ve bazik pH'da lizil, tirozil ve sisteinil rezidüleri üzerindeki negatif yükler nedeniyle çözünür hale gelir. Bir protein çözeltisi, yüklerdeki denge nedeniyle homeostaz aşamasına ulaştığında, belirli bir pH'da proteinlerin yüzey elektrostatik yükünün son durumu net yük olarak adlandırılır. Protein yüzeyinde net negatif veya net pozitif yüklerin oluşması, protein-protein elektrostatik itmelerine ve şişme ve genleşme nedeniyle hidrodinamik hacimde artışa neden olur (Kristinsson vd., 2005; Undeland vd., 2003). Protein molekülü üzerindeki yükler daha pozitif veya negatif hale geldikçe, suyla etkileşime girmeye başlarlar ve bu da aynı anda protein-protein etkileşimlerini azaltır. Dolayısıyla, protein daha fazla polarite (yükli molekül) aldığında, su ile daha fazla etkileşim gerçekleşecek ve böylece çözünürleşmeye neden olacaktır. Yüzeydeki pozitif yüklerin sayısı negatif yüklere eşit olduğunda protein sıfır net yüzey yüküne sahip olur. Net yüzey elektrik yükünün sıfıra eşit olduğu pH, o proteinin izoelektrik noktası (*pI*) olarak adlandırılır. Proteinlerin *pI* değeri spesifiktir ve proteinlerin *pI* değerini bulmak için izoelektrik odaklama tekniği kullanılır (Tahergorabi vd., 2015). Protein *pI* değerine ulaştığında, yüzey net yükleri azalacaktır. Bu da protein-su etkileşiminin azalmasına neden olarak proteinin sudaki çözünürlüğünün azalmasına, düşük su tutma kapasitesine ve zayıf jelleşme kapasitesine yol açar. Aynı zamanda, pH *pI*'ya doğru ilerlediğinde hidrofobik protein-protein etkileşimleri tercih edilecek ve proteinlerin çökmesine neden olacaktır. Proteinlerin izoelektrik noktalarındaki bu davranışı, protein çözünürlüğünü arttırmak veya azaltmak için kullanılmaktadır (Surasani, 2018). Çökelmenin ardından protein izolatu olarak adlandırılan proteinler genellikle bir santrifüjleme yoluyla çözeltiliden toplanmaktadır.

2.3. Proteinlerin Hidrolizi

Hidroliz, su kullanılarak bir maddenin bağlarının parçalandığı kimyasal bir reaksiyondur. Biyokimyada pek çok biyolojik işleyişin bu reaksiyona dayanarak gerçekleştiği gözlenmektedir. Bu parçalanma sırasında parçalanan kısımlardan birine H^+ atomu diğerine ise OH^- grubu bağlanır. Protein hidrolizi ise, çeşitli proteolitik enzimler kullanılarak peptit bağlarının parçalanmasıyla farklı büyüklük ve aminoasit kompozisyonunda peptitlerin elde edilmesini içeren bir süreçtir. Hidroliz aracılığıyla protein kaynaklarından elde edilen polipeptit ve oligopeptit karışımları olarak tanımlanan protein hidrolizatları, kendini oluşturan proteinlerden tamamen farklı fonksiyonel veya biyolojik özellikler içerebilmektedir. Proteinlerindeki peptit bağlarının kimyasal veya enzimatik yollarla su alarak yıkılması ile elde edilen farklı büyüklüklerde peptitlerden ve serbest amino asitlerden oluşan ürüne protein hidrolizatı, yürütülen işleme de protein hidrolizi adı verilmektedir. Protein hidrolizatları içerdikleri peptitlerin zincir uzunluğuna, aminoasit dizisine, aminoasit bileşimine, serbest aminoasitlere ve biyoaktif özelliklerine göre farklılıklar göstermektedirler (Nasri, 2017; Sila ve Bougategf, 2016). Hidroliz işlemine maddenin yapısı, kimyasal ya da enzim tipi, su, endojen enzimlerin inaktivasyonu, pH, sıcaklık ve zamanın etkili olabileceği bildirilmiştir. Hidroliz işlemi proteinlerin özelliklerini molekül ağırlığını azaltarak, iyonlaşabilir grupların sayısını artırarak ve hidrofobik grupların ortaya çıkmasını sağlayarak değiştirmektedir (He vd., 2013; Tavano, 2013).

Protein hidrolizatları mükemmel bir amino asit dengesine sahiptir, kolayca sindirilebilir ve biyoaktif peptitler içermektedir. Biyoaktif peptitler terapötik ajanlar olarak hareket eder ve yüksek biyolojik özgüllük, düşük toksisite, yüksek yapısal çeşitlilik, yüksek ve geniş bir aktivite çeşitliliği ve küçük boyut ile karakterize edilmektedir, bu da istenmeyen bağışıklık tepkilerini tetikleme olasılıklarının düşük olduğu anlamına gelmektedir. Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları ve insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan protein parçaları olarak tanımlanmaktadır. Amino asitlerin dizilimine bağlı olarak, bu peptitler antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, antidiyabetik ve antihipertansif dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyebilmektedirler (Pujiastuti vd., 2019).

Protein hidrolizatları veya biyoaktif peptitler, endüstriyel ölçekte üretimde çeşitli yöntemlerle deniz organizmaları proteinlerinden ekstrakte ve izole edilebilmektedir. Organik çözücü ile ekstraksiyon yöntemi geleneksel olarak

kullanılmaktadır, ancak bu yöntem zaman alıcı, pahalı ve çevre dostu olmayan bir tekniktir. Günümüzde süperkritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı solvent ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon, darbeli elektrik alan destekli ekstraksiyon ve enzim destekli ekstraksiyon gibi daha iyi ekstraksiyon teknikleri tercih edilmektedir (Cheung vd., 2015; Grosso vd., 2015).

2.4. Hidroliz Derecesi

Hidroliz derecesi, bir proteindeki toplam peptit bağı sayısının hidroliz sırasında bölünen yüzdesi olarak tanımlanır. Bir proteinin fonksiyonel özelliklerinin hidrolizle ne ölçüde değiştirilebileceğinin, proteinin hidroliz edilme derecesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Reaksiyon sırasında bölünen peptit bağlarının gerçek sayısı için veya hidroliz derecesi için bir değer elde etmek, protein bozunmasının boyutunu izlemenin etkili bir yoludur (Adler-Nissen, 1986; Spellman vd., 2003). Şimdiye kadar hidroliz derecesi, hidroliz işleminin en etkili ve belki de tek göstergesi olarak kabul edilmiştir. Daha yüksek hidroliz derecesi ile daha fazla bölünmüş peptit bağı oluşmaktadır, bu durum suda daha fazla çözünen küçük moleküler ağırlıklara sahip protein hidrolizatlarının ile sonuçlanmaktadır, böylece hidrolizat içerisindeki proteinli bileşenlerin geri kazanımı artmaktadır (He vd., 2013).

Hidroliz derecesinin tahmini için çok sayıda yöntem mevcuttur. Hidroliz sırasında açığa çıkan ve çökeltici bir maddenin (örneğin trikloroasetik asit) varlığında çözünür hale gelen azot miktarını belirleyerek ölçülebilmektedir. Kolorimetrik yöntemlerde ise belirli bileşiklerin serbest amino gruplarına bağlanması kullanılmaktadır ve renk yoğunluğu serbest amino gruplarının sayısı ile doğru orantılıdır. Absorbans değeri daha sonra genellikle lösin gibi serbest bir amino asit ile hazırlanan standart bir eğri kullanılarak kantitatif değerlere dönüştürülür. Toplam serbest amino gruplarını elde etmek için, tüm protein amino asitlerine ayrıştırılır ve kolorimetrik test için kullanılır (Aluko, 2018). Hidroliz derecesi hesaplanmasında kullanılan kolorimetrik yöntemlerde, formol titrasyonu ile hidroliz sırasında açığa çıkan serbest amino gruplarının belirlenmesiyle veya trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS), orto-ftaldialdehit (OPA), ninhidrin veya floresamin gibi amino gruplarıyla spesifik olarak reaksiyona giren bileşikler kullanılmasıyla ölçülebilmektedir. Bir başka yöntemde ise peptitlerin trikloroasetik asit (TCA) içindeki çözünürlüğünü kullanılmaktadır. TCA süpernatantındaki peptit miktarı daha sonra Kjeldahl yöntemi ile belirlenir ve hidrolizattaki toplam protein ağırlığının yüzde oranı olarak ifade

edilmektedir. TCA yönteminin dezavantajı, başlangıç numunesinin (hidrolizat) zaten sindirilmiş olması ve yüksek miktarda çözünür peptit içermesidir; bu nedenle TNBS ve OPA yöntemlerine göre daha yüksek hidroliz derecesi değerleri elde edilmektedir (Aluko, 2018). Alternatif olarak, bir başka hidroliz derecesi tahmin etme yöntemi olarak pH-stat yönteminde, hidroliz sırasında salınan protonlar titre edilir ve daha sonra hidroliz derecesi ile ilişkilendirilmektedir. Günümüzde, bir proteinin hidrolizi sırasında hidroliz derecesinin ölçümü için en yaygın olarak kullanılan üç yaklaşım pH stat, OPA ve TNBS yöntemleridir. pH-stat tekniğinin prensibi, hidroliz nötr veya alkali koşullarda gerçekleştirildiğinde, serbest kalan serbest amino gruplarından protonların ayrışmasının tercih edilmesidir (Adler-Nissen, 1986). Protonların reaksiyon ortamına salınması, reaksiyon karışımının pH değerinde bir azalmaya yol açmaktadır. Böylece, bölünen peptit bağlarının sayısı, reaksiyon sırasında sabit bir pH değerini korumak için gereken baz miktarından tahmin edilebilmektedir (Adler-Nissen, 1986). OPA yöntemi, 1-alkiltiyo-2-alkil-sübstitüe izoindoller oluşturmak için bir tiyol varlığında OPA ve primer amino grupları arasındaki spesifik reaksiyona dayanmaktadır. Oluşan izoindoller spektrofotometrik olarak 340 nm'de veya florometrik olarak 455 nm'de ölçülebilmektedir. TNBS ise 340 nm'de maksimum absorbansa sahip bir kromofor oluşturmak için özellikle birincil amino gruplarıyla reaksiyona girerek hidroliz derecesini tahmin etmede kullanılmaktadır (Spellman vd., 2003).

2.5. Protein Hidrolizatlarının Elde Edilme Yöntemleri

Biyoaktif hidrolizatlar ve peptitler, ana protein dizisi içinde inaktif olan spesifik protein parçaları olarak kabul edilir (Sarmadi ve Ismail, 2010). Protein kaynağından fonksiyonel etkilere sahip peptitlerin ve aminoasitlerin elde edilmesi için enzimatik hidroliz, mikrobiyal fermentasyon (mikroorganizmaların proteolitik etkisi) veya asit ve alkali çözücülerle kullanılarak kimyasal hidroliz (çözücü ekstraksiyonu) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Borrajo vd., 2019). Ayrıca, gıda işleme sürecinin ve gastrointestinal sindirimin de bu peptitleri serbest bırakabileceğine dikkat etmek önemlidir (Ucak vd., 2021). Bazı çalışmalarda da biyoaktif peptitler üretmek için bu yöntemleri birleştirmiştir. Böylece, hedef biyoaktif peptitleri ekonomik ve etkili bir şekilde elde etmek için en uygun hazırlama yöntemlerini seçmek son derece önemlidir (Yang vd., 2021). Hidroliz koşulları, kullanılan hidroliz türü, amino asit bileşimi, peptitlerin dizilimi ve konfigürasyonu protein hidrolizatlarının biyolojik aktiviteleri ile yakından ilgilidir ve işlevselliğinde önemli bir rol oynar (Borrajo vd., 2019; Ucak vd.,

2021).

2.5.1. Kimyasal Hidroliz

Kimyasal yöntemle protein hidrolizatlarının ve peptitlerinin üretimi yüksek sıcaklık, basınç ve asit ya da alkali çözeltiler kullanılarak uygulanmaktadır. Ancak, güçlü asit veya bazların kullanılması kimyasal süreçleri ekolojik olarak kabul edilemez hale getirmektedir (Anal vd., 2013). Ayrıca, ekonomik üretim maliyeti sağlasa da spesifik olmayan kimyasal işlem sırasında hidrolizatta istenmeyen ürünler oluşabileceğinden, kimyasal hidroliz, besleyici nitelikleri ve biyolojik aktiviteleri azalmış ürünler vermektedir ve ekipman korozyonuna sebep olmaktadır. Alkali hidroliz esnasında rasemizasyon olarak adlandırılan L-aminoasit formunun insan vücudunun kullanamadığı D-aminoasit formuna dönüşümü gerçekleşmektedir. Alkali hidroliz koşulları altında, asparjin ve glutamin sırasıyla aspartik asit ve glutamik aside tamamen hidrolize olmaktadır. Triptofan tamamen yok olur ve sistein asitle hidrolize edilmiş örneklerden doğrudan belirlenemez. Tirozin, serin ve treonin kısmen hidrolize olur (Ghaly vd., 2013). Bu tekniğin dezavantajı bir diğeri de lizialain, ornitinoalanin, lantionin ve β -amino alanin gibi istenmeyen maddelerin oluşmasıdır. Kimyasal hidroliz sonunda ortamın pH'ını nötre yakın değerlere getirme işlemi olan nötralizasyon işlemi ile aşırı tuz oluşmakta, tirozin, serin ve treonin kısmen ve esansiyonel amino asit olan triptofan tamamen tahrip olmaktadır. Buna ek olarak, asit hidrolizi ile muamele sistein ve metiyonini okside etmekte, serin ve treonini yok etmekte ve glutamin ve asparajini sırasıyla glutamat ve aspartata dönüştürebilmektedir (Ghaly vd., 2013). Öte yandan, kimyasal hidroliz ile elde edilen protein hidrolizatlarının biyoaktiviteleri, peptit bağlarının kimyasal reaktifler tarafından bölünmesi spesifik olmadığından yeniden üretilemez. Bu nedenle, hidroliz sürecindeki yüksek varyasyonlar biyoaktivitede yüksek varyasyonlara yol açmıştır. Bu dezavantajlar, bu protein hidrolizatlarının yüksek değerli uygulamalarını önemli ölçüde sınırlamıştır. Kimyasal hidrolizde üretim faktörlerini kontrol etmek güç olduğundan, ürünler farklı kompozisyon, fonksiyonel ve biyolojik özellik gösterebilmektedir. Güçlü kimyasallarla, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleşen hidroliz sonunda hidrolizatların besleyici değeri azalmakta, fonksiyonel özellikleri gerilemekte ve biyolojik olarak gösterdikleri aktivitelerinde düşüş meydana gelmektedir (Nasri, 2017).

2.5.2. Mikrobiyal Fermentasyon

Doğal veya kontrollü fermentasyon, farklı gıda maddelerini korumak ve besleyici veya duysal özelliklerini korumak veya değıştirmek için binlerce yıldır insanoğlu tarafından kullanılmaktadır (Korhonen vd., 1998). Mikrobiyal fermentasyon, biyoaktif peptitlerin elde edilebildiğı biyoteknolojik bir süreçtir. Bu süreç, proteolitik enzimler üretebilen mikroorganizmaların, bu enzimlerin proteinleri daha kısa peptitlere hidrolize etmesi amacıyla kullanılmasını içermektedir (Cruz-Casas vd., 2021). Biyoaktif peptitleri elde etmek için kullanılabilen bu yöntem bakterilerin doğal metabolizmalarından kaynaklanmaktadır; burada mikroorganizmalar kendi enzimleri peptitleri serbest bırakır çünkü yaşamları için gerekli olan azot kaynağı olarak ortamda bulunan proteinlere ihtiyaç duymaktadırlar. Mikrobiyal fermentasyon yoluyla izole edilen biyoaktif peptitlerin çoğu süttten, yumurtadan ve kazein gibi protein kaynaklarından elde edilmiştir. *Laktobasillus* türleri daha yüksek proteolitik aktivitesi nedeniyle kullanılan en yaygın bakteridir (Borrajıo vd., 2019). Mikrobiyal fermentasyon, mikroorganizmaların metabolik ve fermentasyon faaliyetleri yoluyla farklı amino asit dizilerine ve moleküler kütlelere sahip çeşitli aktif peptitler üretmek için kullanılabilir. Biyoaktif peptitlerin üretimi için mikrobiyal fermentasyon yöntemi, fermente gıdadaki peptitlerin doğrudan alınmasına izin veren, yüksek güvenliğe sahip ve enzim tarafından üretilen peptitlerin saflaştırılması ihtiyacını önleyebilen ve üretim maliyetlerini azaltabilen ürünler için kullanılabilir. Mikrobiyal fermentasyon yoluyla biyoaktif peptitlerin hazırlanması, endüstriyel gıda işleme sırasında ortaya çıkan atık malzemeleri etkili bir şekilde geliştirebilir ve kullanabilir, bu da ekonomik faydalar sağlamaktadır (Yang vd., 2021).

Bazı bakteriler, fermentasyon sırasında biyoaktif peptit üretiminin kaynağı olan proteolitik sistemlere sahiptir. Mikrobiyal fermentasyona hücre duvarına bağı proteazlar veya hücre içi peptidazlar, özellikle endopeptidazlar, aminopeptidazlar, tripeptidazlar ve dipeptidazlar aracılık edebilmektedir. Hidroliz derecesi fermentasyon süresine, mikrobiyal suşa ve protein kaynağına bağıdır. Mikrobiyal suşlar açısından, yüksek proteaz-aktif bakteriler, funguslar ve mayalar en yaygın kullanılanlardır. Farklı suşların protein materyalleri üzerinde farklı etkileri vardır. Ayrıca, farklı protein materyallerinin ve fermentasyon koşullarının seçimi, fermentasyonun bir diğer anahtarıdır. Fermentasyonu etkileyen beş ana faktör arasında inokülasyon miktarı, pH,

substrat konsantrasyonu, fermentasyon süresi ve sıcaklık yer almaktadır (Yang vd., 2021).

Mikrobiyal fermentasyon, diğer peptit dağıtım tekniklerinde bulunmayan bazı faydalar sağlar. Örneğin, farklı boyutlarda ve dizilerde peptitler üreten yüksek çeşitlilikte mikrobiyal proteazlara ve bu nedenle daha yüksek biyolojik aktivitelere sahiptirler. Aynı şekilde, enzimatik hidrolizde olduğu gibi sadece bir proteaz değil, mikroorganizmanın karakteristik proteaz setinin tamamı hareket ettiğinden, yüksek düzeyde proteaz aktivitesine sahiptirler, bu da peptitin öncü proteinden yeterli bir şekilde salınmasına yol açar. Sonuç olarak, kullanılan mikroorganizmaya ve koşullara bağlı olarak üretim döngüleri daha kısadır. Mikrobiyal fermentasyon biyoaktif peptitlere ek olarak canlı ve ölü bakteri hücreleri, ekzopolisakkaritler ve bakteriyosinler gibi biyolojik özellikler gösteren başka bileşikler de üretebilir ve bu nedenle gösterilen biyoaktivitelerin peptitlerin mi yoksa bu bileşiklerin mi bir etkisi olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır (Cruz-Casas vd., 2021). Bununla birlikte, fermentasyon sürecinin dezavantajı, fermentasyon sırasında, proteolitik mikroorganizmadan türetilen enzimlerin etkisiyle gıda proteinlerinden salınan bazı biyopeptitler ve amino asitler, mikroorganizmaların kendileri tarafından büyümesi için karbon ve/veya azot substratı olarak kullanılacak olması nedeniyle üretilen peptitler düşük verimlidir (Nasri, 2017). Kullanılacak besin maddelerinin ve oksijenin sınırlı ya da sınırsız olması, rekabetçi mikroorganizmaların varlığı ve zaman gibi faktörler doğru uygulanmadıkları takdirde fermentasyon sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle mikrobiyal fermentasyon gerçekleştirilmeden önce uygun parametrelerin araştırılması tavsiye edilmektedir. Son olarak, biyoteknolojik bir süreç olan mikrobiyal fermentasyon, ticari enzimler kullandığı için daha iyi olan enzimatik hidrolize kıyasla partiler arasında zayıf tekrarlanabilirlik sorunlarına açıktır, ayrıca optimum koşullar altında çalışmadıklarında belirli enzimlerin aktivitesindeki farklılıklar nedeniyle eksiklikleri de vardır (Cruz-Casas vd., 2021).

2.5.3. Enzimatik Hidroliz

Bu yöntem, biyoaktif peptitleri elde etmek için ticari enzimlerin kullanılmasını içerir, çünkü bu ticari enzimler proteinin yapısındaki peptit bağlarının bölünmesinden ve böylece şifrelenmiş peptitin serbest bırakılmasından sorumludur. Bu yöntemde enzimin faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi öncelikle protein kaynağı olan substrata bağlanması ve ardından enzimatik kataliz ile devam etmesi esasına dayanmaktadır.

Bunun için enzim, substrat ile geçici bağlar oluşturan kalıntılar ve substrat ile reaksiyonu katalizleyen kalıntılar içeren spesifik aktif bölgelere sahiptir. Bu şekilde sırasıyla bağlanma bölgeleri ve katalitik bölgeler oluşur. Enzim-substrat kompleksini oluşturan bağlar genellikle hidrojen bağları, hidrofobik bağlar veya Van der Waals etkileşimleridir. Son olarak, enzim-substrat kompleksi belirli bir konformasyonda olduğunda, protein hidrolizini sağlayabilmektedir (Cruz-Casas vd., 2021).

Enzimatik hidroliz, proteinlerinin besleyici değerlerini etkilemeden fizikokimyasal, duyuşal, teknolojik ve biyolojik olarak fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için modifikasyonunda başarıyla kullanılan bir yöntemdir. Enzim, sıcaklık, pH ve enzim: substrat oranı seçimi, uygun bir hidroliz derecesinin elde edilmesi için çok önemlidir. Enzimatik yöntemde kullanılan enzimler birçok endüstride istenilen reaksiyonun katalizlenmesinde ve yüksek değerli ürünlere dönüştürülmesinde kullanılmaktadır. Hidroliz işleminde kullanılan proteolitik enzimler, ekonomik olarak en önemli enzim gruplarının içerisinde yer almaktadır. Proteolitik enzimlere proteazlar, proteinazlar ve peptidazlar da denilmektedir. Proteazlar, proteinlerin yapısını oluşturan amino asitler arasındaki peptid bağlarının su molekülü olarak ayrılmasını sağlayan hidroliz reaksiyonunu katalizlemekten sorumludurlar. Proteazlar tarafından gerçekleştirilen katalizleme işlemi orijinal peptid zinciri ile enzim arasında Michaelis kompleksinin oluşumu, peptid bağının koparılıp iki peptitten birinin serbest kalması ve nükleofilik ataklarla enzim-peptid kompleksinin ayrılması ve diğer peptid ile enzimin serbest kalması olarak 3 temel reaksiyondan oluşmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000). Proteazlar, parçaladıkları peptid bağlarının özgülüğüne göre serin, tiyol, karboksil ve metaloproteinazlar olarak dört ana sınıfa ayrılabilir. Ayrıca hidroliz mekanizmalarına göre de endoproteinazlar veya ekzopeptidazlar olarak sınıflandırılabilirler. Endoproteinazlar proteini oluşturan polipeptid zincirindeki peptid bağlarını uçlardan uzak iç kısımlarda hidrolize ederler ve daha küçük boyutta suda çözünebilir peptitler oluştururlar. Ekzoproteazlar ise karboksil (-COOH) veya amino (-NH₂) uçtan peptid bağlarını kopararak serbest aminoasitlerin ayrılmasını sağlarlar. Ekzoproteazlardan amino ucundan ayıranlara aminoproteaz, karboksil ucundan ayıranlara ise karboksiproteaz adı verilmektedir (Ewert vd., 2022).

Enzimatik hidroliz, maksimum peptid verimi elde etmek için optimum koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Enzimatik hidrolizde kullanılan proteolitik enzimler hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli olabilmektedir. Genellikle kullanılan başlıca

peptidazlar papain (papaya meyvesinden sistein proteaz), bromelain (ananas meyvesinden sülfhidril proteaz), termolizin (*Bacillus thermoproteolyticus* bakterisinden metaloproteaz), Alkalaz (*Bacillus licheniformis* bakterisinden serin proteinaz), Flavourzyme (*Aspergillus oryzae* fungusundan proteaz karışımı), Protameks (*Bacillus* proteaz karışımı) pepsin, tripsin ve kimotripsin (hayvanların midesi ve pankreası tarafından salgılanan enzimler) gibi enzimlerden oluşmaktadır (Borrajo vd., 2019). Ancak, bunların arasından biyoaktif peptitler üretmek için ticari olarak en popüler ve en çok kullanılanları Alkalaz, Protameks ve Flavourzyme'dir (Cruz-Casas vd., 2021). Kullanılan enzimlerde aranan temel özellikler; gıda endüstrisinde kullanılabilir özellikte olması ve mikroorganizma kökenli ise patojen olmayan organizmalardan elde edilmiş olmasıdır. Genel olarak mikroorganizmalardan üretilen enzimler, hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre geniş katalitik aktivite göstermeleri, pH ve sıcaklık stabilitelerini yüksek olması gibi avantajları nedeniyle hidrolizat üretiminde daha çok tercih edilmektedir (He vd., 2013; Kristinsson ve Rasco, 2000). Protein hidrolizinde kullanılan enzim türleri, peptit bağlarının parçalanma modellerini belirledikleri için çok önemlidir. Proteaz özgüllüğü, peptitlerin boyutunu, miktarını ve amino asit bileşimini etkilemektedir ve bu da hidrolizatların biyolojik aktivitesini etkilemektedir. Enzimatik hidroliz; ekstrem sıcaklık ve pH koşullarına ihtiyaç duymaması nedeniyle aminoasit yapısına zarar vermemesi, sürecin daha kolay kontrol edilebilmesi, toksik ürünlerin ortaya çıkmaması ve protein hidrolizatlarının besleyici özelliklerinin ve biyolojik aktivitelerinin daha iyi korunması gibi avantajlarından dolayı, kimyasal hidroliz ve mikrobiyal fermentasyon yöntemlerine kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. Bu nedenle, yukarıda açıklanan proteolitik enzimlerle kontrollü bir ortamda enzimatik hidrolizin kullanılması, daha tutarlı bir moleküler ağırlık profili ve peptit bileşimi sağladığından, insan tüketimine yönelik ürünlerde kullanılmak üzere deniz organizmaları ürünlerinden biyoaktif hidrolizatların ve peptitlerin üretilmesi için en umut verici yöntemdir. Bununla birlikte, enzimatik hidroliz yöntemi gıda ve ilaç endüstrilerinde tercih edilmektedir çünkü diğer yöntemler nihai ürünlerde kalıntı organik çözücüler veya toksik kimyasallar bırakabilmektedir (Sila ve Bougatef, 2016). Ancak diğer yöntemlerde olduğu gibi bu yönteminde dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi bu yöntem, fermentasyon gibi diğer süreçlere kıyasla pahalıdır çünkü enzimlerin maliyeti yüksektir ve aktif tutmak için özel olarak gereklidir. Bunun için önerilen çözüm ise günümüzde hidroliz süreci, protein kaynağını mikrodalga, ultrason,

yüksek voltajlı darbeli elektrik alanı ve hidrostatik yüksek basınç destekli teknikler ile önceden muamele ederek geliştirilmektedir, böylece kullanılan enzim miktarını en aza indirmektedir ve daha yüksek hidroliz oranları elde edildiği bildirilmiştir (Cruz-Casas vd., 2021). Deniz organizmaları proteinlerinden kontrollü enzimatik hidroliz ile üretilen hidrolizatların antioksidan, ACE inhibitörü, kalsiyum bağlayıcı, antihipertansif, antikoagülan, antikanser, antimikrobiyal, HIV-1 proteaz inhibitörü, anti-anemi ve iştah bastırıcı aktivite gibi biyoaktif özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2012, 2013a). Ayrıca, deniz yumuşakçaları proteinlerinin enzimatik hidrolizi, gastrointestinal sindirimi simüle etmek amacıyla tek tek proteazlar veya sindirim proteazlarının bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

2.5.3.1. *In vitro* gastrointestinal sindirim

Peptitlerin insan vücudunda biyolojik etkilerini gösterebilmeleri için gastrointestinal sistemden geçtikten sonra gastrointestinal enzimlerin etkisine direnerek biyolojik aktivitelerini korumaları gerekir. Gastrointestinal enzimlere maruz bırakıldıktan sonra peptitlerin biyolojik aktivitesini test etmek için genellikle *in vitro* gastrointestinal sindirim yaklaşımı kullanılmaktadır (Neves vd., 2016b). Proteinlerin ve peptitlerin gastrointestinal sindirimin farklı aşamaları olan yutma, sindirim ve emilim sırasında hidrolize duyarlı olduğu kabul edilmiştir. Bu proteinler ve peptitler sindirildikten sonra, gastrointestinal sistemde bulunan pepsin, tripsin, kimotripsin ve epitel hücrelerinin yüzeyindeki peptidazlar gibi farklı enzimler tarafından hidrolize tabi tutularak çeşitli uzunluklarda peptitler ve aminoasitler açığa çıkmaktadır (Hernández-Ledesma vd., 2011). Dahası, bu enzimler tarafından proteinlerin hidrolizi sonucunda biyoaktif peptitler oluşabilmektedir. Ayrıca, *in vitro* gastrointestinal sindirim, gastrointestinal enzimlerin aktivitesinin, kontrollü enzimatik hidroliz ile üretilen biyoaktif peptitlerin gücünü artırma veya azaltma potansiyeline sahip olduğunu bildirilmiştir (Neves vd., 2016b). Bu nedenle, biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sindirim ile stabilitesinin test edilmesi, tüketimden sonra bu peptitlerin biyoyararlanımını değerlendirmek için iyi bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, pepsin, tripsin ve α -kimotripsin ile inkübasyondan sonra aktivitesini koruyan istiridyeden elde edilen ACE inhibitör peptit Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe gibi bazı balık ve kabuklu deniz ürünleri kaynaklı biyoaktif peptitlerin gastrointestinal sindirime dirençli olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2008).

2.6. Deniz Yumuşakçalarının Sindirilebilirliği ve Biyoyararlanımları

Proteinler insanlar için en önemli makro besin maddesi olarak kabul edilir ve besin değerleri, amino asitler ve azot için metabolik talepleri karşılama kapasitelerine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Bu nedenle, gıdalardaki protein kalitesi genellikle esansiyel amino asit (EAA) bileşimi ile belirlenir. Gıda ürünlerinin kalitesi, diyet proteininin vücudun metabolik işlevini yerine getirme ihtiyacını karşılamak için amino asit sağlama yeteneğine bağlıdır ve sağlık ve fizyolojik koşullara göre değişir. Gıda ürünlerindeki EAA'ların biyoyararlanımı sadece protein ve amino asit içeriğine bağlı değildir, aynı zamanda proteinin kalitesi de önemli bir rol oynar. Bu nedenle, bir gıda ürününün amino asit profilinin belirlenmesi, vücudun bireysel amino asit ihtiyaçlarını karşılama kapasitesine ilişkin protein kalitesiyle birlikte, tüketicinin amino asit beslenmesini tatmin etmek için kilit bir faktördür. Şimdiye kadar, gıda ürünlerinin protein kalitesinin değerlendirilmesi için amino asit skoru, *in vitro* protein sindirilebilirliği, protein verimlilik oranı, net protein kullanımı, protein verimlilik oranı, *in vivo* protein sindirilebilirliği, biyolojik değer, net protein tutma ve protein sindirilebilirliği düzeltilmiş amino asit skoru (PDCAAS) dahil olmak üzere çeşitli yöntemler test edilmiştir (Desai vd., 2018). Bu yöntemler genellikle amino asitlerin ve/veya proteinlerin sindirilebilirliği ve biyoyararlanımı temelinde değerlendirme yapar. FAO/WHO (1991) gıda protein kalitesini değerlendirmek için PDCAAS'nın kullanılmasını önermiştir. PDCAAS, insan gıdalarındaki protein kalitesini değerlendirmek için 20 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Çünkü bu beslenme indeksi, sindirilen besinsel azotun güvenli protein alım seviyesinde insan amino asit gereksinimlerini karşılama etkinliğini dikkate almaktadır (WHO/FAO/UNU, 2007). PDCAAS, protein kalitesini belirlemek için en uygun indekstir çünkü hem insanların amino asit gereksinimlerine hem de bunu sindirme yeteneklerine dayanan bir yöntemdir ve sonunda genel protein kalitesini değerlendirme ihtiyacının yerini alabilir (Cepero-Betancourt vd., 2017; Schaafsma, 2000). Ayrıca PDCAAS, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından protein için günlük değer yüzdesini belirlemek için standart olarak kullanılmaktadır. PDCAAS yöntemine göre, bir gıda proteininin besinsel kalitesi, EAA'ların içeriği ve ham proteinin toplam sindirilebilirliği ile belirlenebilmektedir. Amino asit skoru, her bir EAA içeriğinin okul öncesi çağıdaki bir çocuğun (2-5 yaş arası) gereksinimlerine dayanan bir referans protein kaynağındaki (kazein) aynı amino asit içeriğine bölünmesiyle hesaplanır. PDCAAS hesaplanırken,

ilk sınırlayıcı amino asit skoru protein sindirilebilirliği ile çarpılır. PDCAAS skorunun 1 olması, sindirimden sonra proteinin organizmanın ihtiyaç duyduğu EAA'ların %100'ünü sağladığını göstermektedir (WHO/FAO/UNU, 2007). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre PDCAAS, besinsel proteininin kalitesinin yanı sıra vücuttaki protein sentezine katılma yeteneğini de ifade etmektedir (WHO/FAO/UNU, 2007). Bununla birlikte, PDCAAS, sindirilen amino asit sayısını fazla tahmin ettiği, hayvansal proteinlerin parçalanmasıyla yüksek besin değerini hafife aldığı ve beslenme karşıtı faktörlerin ve gıda işlemenin etkilerini dikkate almadığı için eleştirilmektedir (Desai vd., 2018).

Yumuşakçalar gibi deniz organizmaları birçok ülkede günlük diyetin bir parçası olarak tüketilmektedir ve protein ve azotlu bileşenler açısından zengindir. Deniz ürünlerinden elde edilen bu proteinler için PDCAAS'nın belirlenmesi protein kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır, ancak bugüne kadar yumuşakçaların protein sindirilebilirliği hakkında yalnızca sınırlı sayıda rapor bulunmaktadır (Cepero-Betancourt vd., 2017; Dayal vd., 2013; Zlatanov vd., 2009) ve bildiğimiz kadarıyla limpet proteinleri hakkında henüz bir veri rapor edilmemiştir.

Biyoyararlanım, bir protein veya bileşiğin/besinin sindirimi, asimilasyonu ve biyoaktivitesini ifade etmektedir. Proteinin kullanımını içerir ve alınan proteinin sistemik dolaşıma ulaşan ve kullanılan kısmı olarak tanımlanabilir. Ayrıca, bir proteinin biyoyararlanımı, sistemik dolaşıma ulaşabilen protein fraksiyonunu ifade etmektedir (Hayes, 2018). Peptitlerin *in vitro* aktiviteleri *in vivo* aktivitelerinden farklı olabilmektedir. Bu nedenle, izole edilmiş veya gıda ya da ilaçlara dahil edilmiş peptitler sindirildiğinde, biyoaktivitelerinin azalmasına neden olabilecek çeşitli faktörlere karşı direnç göstermeleri gerekmektedir (Bhandari vd., 2020; Cunha ve Pintado, 2022). Bu nedenle, gastrointestinal sindirim çalışmaları, peptitlerin biyoyararlanımını anlamak için önemlidir; bu durum, bileşiğin eylemini gerçekleştireceği hedef bölgede mevcut olan miktardır (Bleakley ve Hayes, 2017). Peptitlerin enzimlerin etkisine ve olumsuz pH koşullarına karşı direnç gösterme kabiliyeti, moleküler ağırlıklarından, amino asit dizilerinden ve terminal rezidülerinden etkilenebilmektedir (Cunha ve Pintado, 2022).

Peptitlerin biyoyararlanımını incelemek için hem *in vitro* hem de *in vivo* deneyler yapılabilmektedir. *In vivo* testler, peptit içeren ürünler sindirilirken neler olabileceğinin garantili gözlemidir, ancak bu testler karmaşık ve pahalıdır, hayvanların

veya insanların kullanımını içermektedir ve zaman açısından uzundur. Bu nedenle, *in vitro* testler ilk olarak gastrointestinal sindirimden sonra peptit biyoaktivitesinin potansiyelini belirlemek için kullanılabilmektedir ve *in vivo* test edilecek en yüksek potansiyele sahip olanların farklı örnekler arasından seçilmesine izin vermektedir. Test edilen biyoaktivite korunursa, bu peptitler önceki sonuçları doğrulamak için bir *in vivo* çalışma için uygun olabilir. Biyoaktivite *in vitro* olarak kaybolursa, *in vivo* testlere geçmeden önce peptit konsantrasyonu veya ürün özellikleri yeniden gözden geçirilmelidir. Peptitlerin sindirilirken davranışlarını *in vitro* olarak anlamak için gastrointestinal sistemin bir simülasyonu yapılabilmektedir. *In vitro* testler, peptitleri test etmeye başlamak için her zaman en etkili yoldur. *In vitro* testlerle, peptitlerin potansiyel biyoaktivitelerini anlamak, aynı anda farklı konsantrasyonlarda birkaç peptiti test etmek, daha ileri *in vivo* testler için en iyilerinin ön seçimine izin vermek; hayvanlara veya insanlara sunulmadan önce peptitlerin güvenliğini ve risklerini anlamaya izin vermek mümkündür. Bununla birlikte, biyoyararlanım, biyokinetik ve diğer faktörler nedeniyle, hayvanlarda veya insanlarda kullanım için *in vitro* olarak elde edilen sonuçları doğrudan değerlendirmek mümkün değildir (Cunha ve Pintado, 2022). Ayrıca, hayvanlarda test edilmeyen ürünlere yönelik arayışlar artmakta, bu da hayvanları deneysel araştırmalarda kullanım ihtiyacını en aza indirmek veya ortadan kaldırmak için *in vivo* koşulları daha güvenilir bir şekilde taklit eden alternatif test yöntemlerinin araştırılmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, peptitler sağlık açısından birçok ilginç fayda sağlayabilse de, enzimlere ve farklı pH aralıklarına maruz kaldıktan sonra ilgili özelliklerini koruyup korumadıklarını anlamak için sindirimin biyoyararlanımlarını nasıl etkileyeceğini anlamak gerekmektedir. Sindirimden sonra peptit biyoaktiviteleri korunmadığında, peptitleri korumaya yönelik yöntemler test edilmelidir (Cunha ve Pintado, 2022). Bunlar arasında hidrolizatların *in vitro* gastrointestinal sindirimi, sitotoksisitelerinin değerlendirilmesi veya hücre kültürü tabanlı bağırsak tabakası modelleri yoluyla peptit geçirgenliği yer almaktadır (Nongonierma ve FitzGerald, 2017b).

İnsan deneyleri genellikle maliyetli ve etik açıdan tartışmalı olduğundan, proteinlerin potansiyelini değerlendirmek için *in vitro* gastrointestinal sindirim yaygın olarak kullanılmaktadır (Hayes, 2018). INFOGEST yöntemi, Minekus vd. (2014) tarafından geliştirilen insan gastrointestinal koşullarını taklit eden uluslararası bir statik *in vitro* sindirimdir. INFOGEST yöntemi, *in vivo* koşulları *in vitro* olarak taklit

etmek için kullanılması gereken oral, gastrik ve gastrointestinal sindirim yöntemlerini içeren bir parametre çerçevesi önermiştir (Hayes, 2018). Ayrıca, zaman, sıcaklık ve enzim kullanımı gibi farklı parametreler tanımlanmıştır. Yöntem, protein sindirimine ilişkin bazı parametrelerin açıklığa kavuşturulduğu üç laboratuvarlar arası çalışmada doğrulanmıştır (Brodkorb vd., 2019; Egger vd., 2016). Bu çalışmalar aynı zamanda uzlaşma yönteminin *in vitro* sindirim çalışmalarında tutarlılığın artmasına ve daha iyi karşılaştırılabilirliğe yol açtığını göstermiştir. Simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında proteinlerin *in vitro* sindirimi, biyoaktif peptitlerin muhtemelliğini belirlemek için pepsin ve pankreatin gibi ticari enzimler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Protein hidrolizine yönelik *in vitro* çalışmalar, çoğunlukla domuz veya sığır kaynaklı ticari enzimler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı hayvan kaynaklarından saflaştırılan ticari enzimlerin muhtemelen işlevsellik, özgüllük ve kararlılık açısından farklılık göstermesinin mümkün olacağı bildirilmiştir (Tapal ve Tikü, 2019).

2.7. Deniz Yumuşakçalarının Biyolojik Aktiviteleri

Biyoaktif hidrolizatlar ve peptitler, algler, yumuşakçalar, balıklar ve deniz kabukluları gibi çeşitli deniz organizmalarından elde edilmiştir. Deniz organizması peptitlerinde en çok tanımlanan biyoaktiviteler antihipertansif ve antioksidan aktivitelerdir. Yumuşakçalardan elde edilen biyoaktif hidrolizat ve peptitlerin antimikrobiyal ve antienflamatuar etkileri diğer kaynaklara göre daha sık elde gözlemlendiği bildirilmiştir (Cunha ve Pintado, 2022). Ayrıca bazı hidrolizat ve peptitlerin birden fazla biyoaktivite sergilediğini bildirilmiştir ve hem antioksidan hem de antihipertansif aynı peptitte en sık görülenlerdir. Bu durum bir deniz mikroalg türü olan *Chlorella vulgaris* kaynaklı peptit VECYGPNRPF (Sheih vd., 2010; Sheih, Wu, vd., 2009), deniz salyangoz türü *Halotis discus* peptidi ATPGDEG (Qian vd., 2018), mavi midye türü *Mytilus edulis*'ten elde edilen protein hidrolizatu (Neves vd., 2016a), yeşil kabuklu midye türü *Perna canaliculus*'tan elde edilen peptit hidrolizatu (Jayaprakash ve Perera, 2020), deniz atı *Hippocampus abdominalis*'ten elde edilen peptit IGTGIPGIW (Kim vd., 2019) ve *Merluccius productus*'den elde edilen balık proteini hidrolizatu için gözlemlenmiştir (Samaranayaka vd., 2010).

2.7.1. Antioksidan Aktivite

Günümüzde, hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen (O_2), hipoklorit (ClO^-), NO radikali ($\cdot\text{NO}$) ve

peroksinitrit radikali (ONO^{-2}) gibi serbest radikallerin üretimiyle sonuçlanan sigara, alkol, işlenmiş gıda ve stres gibi çeşitli dış faktörler tarafından üretilen oksidasyona yüksek oranda maruz kalmak yaygındır (Lobo vd., 2010). Serbest radikallerin çoğu, hücre hasarına ve lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi çeşitli moleküllerin değişmesine neden olma yeteneğine sahip kararsız ve oldukça reaktif türlerdir; bu durum kanser, kardiyovasküler hastalık, nörolojik hastalık, akciğer hastalığı gibi insan hastalıklarına yol açabilmektedir. Bu nedenle antioksidanlar, serbest radikallerin fazlalığını nötralize etme veya onları indirgemek ya da bozulmalarına yol açarak radikal oluşumunu önleme yetenekleri nedeniyle oldukça önemlidir (Lobo vd., 2010). Ayrıca, lipit peroksidasyonu gıdaların kalitesindeki bozulmanın (ekşime ve "kötü tatlar") önemli bir nedenidir. Butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), tert-butilhidrokinon (TBHQ) ve propil gallat gibi sentetik antioksidanlar lipit oksidasyonunu geciktirmek için gıda ürünlerine eklenmektedir. Ancak, sentetik antioksidanların gıda katkı maddesi olarak kullanımına ilişkin güvenlik endişeleri bulunmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Sonuç olarak, yan etkileri çok az olan veya hiç olmayan doğal antioksidanlar, potansiyel sağlık yararları ve gıda kalitesini uzatma yetenekleri açısından ilgi çekmektedir.

Çeşitli deniz organizmaları enzimatik hidroliz yoluyla üretilen antioksidan peptit kaynaklarıdır. Aslında en önemli doğal antioksidan peptitlerden biri, hayvan ve bitki hücrelerinde sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı, sistein içeren bir tripeptit (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) olan glutatyondur (GSH), bir indirgeyici ajan olan bir tiyol grubuna sahiptir ve geri dönüşümlü olarak oksitlenebilir ve indirgenebilir (Lobo vd., 2010). Peptitlerin kesin yapı-antioksidan aktivite ilişkisi henüz kurulmamış olsa da, peptitte bulunan amino asitlerin türü, konumu ve hidrofobikliğinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Histidin, lösin, tirozin, metiyonin ve sistein gibi amino asitlerin, elektron eksikliği olan radikallere proton bağışlayarak radikal süpürme aktivitesini artırdığına inanılmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Ayrıca, amino asitlerin işbirliği içinde ve sinerjik olarak hareket ettiği görülmektedir ve Glutamin-Prolin (Gln-Pro) ve Prolin-Tirozin (Pro-Tyr) gibi bazı kombinasyonlar daha yüksek antioksidan aktivite ile ilişkilendirilmektedir (Davalos vd., 2004; Zou vd., 2016). Ek olarak, valin veya lösin genellikle prolin, histidin veya tirozin içeren antioksidan peptitlerin N terminalinde bulunduğu bildirilmiştir (Zou vd., 2016).

Antioksidan peptitler, algler, yumuşakçalar ve balıklar gibi deniz

organizmalarından elde edilen ve üzerinde en çok çalışılan peptit türlerinden biridir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalar için en ilginç peptit türlerinden biridir. Kalamar (*Dosidicus gigas*)’dan elde edilen biyoaktif peptitin, linoleik asit model sisteminde lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği, aktivitesinin kontrol olarak kullanılan antioksidan bileşik α - tokoferolden çok daha yüksek olduğu ve sentetik antioksidan BHT'ye yakın olduğunu bildirilmiştir (Mendis vd., 2005). Ayrıca, istiridyeden (*Crassostrea gigas*) elde edilen biyoaktif antioksidan peptitin, çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonuna karşı doğal antioksidan olan α - tokoferolden daha yüksek koruyucu aktivite sergilemiş olduğu bildirilmiştir (Qian vd., 2008). Bununla birlikte, lipit içeren gıdaları oksidasyona karşı korumak için doğal antioksidanlar olarak yumuşakçalar gibi deniz organizmaları antioksidan protein hidrolizatları ve peptitlerin potansiyelini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, deniz organizmalarından antioksidan biyoaktif peptitler, farmasötiklerde, nutrasötiklerde ve sentetik antioksidanların yerine büyük bir potansiyel kullanıma sahip umut verici alternatif bir kaynak olarak görülmektedir (Cunha ve Pintado, 2022).

2.7.2. Antihipertansif Aktivite

Kardiyovasküler hastalık dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olarak tanımlanmıştır (Sheih, Fang, vd., 2009). Yüksek kan basıncı veya hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık gelişiminde kontrol edilebilir bir risk faktörüdür (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Yüksek kan basıncı gelişmiş ülkelerde giderek yaygınlaşmaktadır ve kalp krizi, ödemle ilgili kalp yetmezliği, damar sertleşmesi, inme ve son dönem böbrek hastalığı için başlıca bağımsız risk faktörlerinden biridir (Kannel ve Higgins, 1990). Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE), anjiyotensin-I'i güçlü bir damar daraltıcı olan anjiyotensin-II'ye dönüştürerek kan basıncının düzenlenmesinde kritik bir fizyolojik rol oynamaktadır. Bu nedenle, ACE aktivitesinin inhibisyonu hipertansiyonun önlenmesinde önemli bir hedef olmaktadır (Shahidi ve Zhong, 2008).

Periferik kan basıncı bir dizi biyokimyasal yolla kontrol edilir. Bunlar arasında renin-anjiyotensin sistemi (RAS), kinin-nitrik oksit sistemi, nötral endopeptidaz sistemi ve endotelin dönüştürücü enzim sistemi bulunmaktadır (FitzGerald vd., 2004). Hipertansiyon ve kalp yetmezliğinin tedavisi, RAS yolunun terapötik manipülasyonuna ve özellikle iki anahtar enzim olan renin ve ACE'nin inhibisyonuna odaklanmıştır. RAS aktivitesi, anjiyotensinojen peptitinin asit proteaz renin tarafından anjiyotensin I'e bölünmesiyle başlatılmaktadır (FitzGerald vd., 2004). İnaktif

dekapeptit anjiyotensin I ise karboksidiptidaz ACE tarafından damar daraltıcı anjiyotensin II'ye dönüştürülür (Meisel vd., 2006). Hipertansiyon tedavisinde kullanılan sentetik renin ve ACE inhibitörleri arasında aliskiren (renin), kaptopril, enalapril, alcacepril ve lisinopril bulunmaktadır. Bu sentetik inhibitörler antihipertansif ilaçlar olarak oldukça etkili olmalarına rağmen, öksürük, alerjik reaksiyonlar, tat alma bozuklukları ve deri döküntüleri gibi olumsuz yan etkilere neden olmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Genel olarak, antihipertansif peptitlerin etki mekanizması sentetik ilaçlarınkinden farklıdır. Sentetik ilaçlar temel olarak ACE'nin etkisine müdahale ederek ACE'yi ayırım gözetmeksizin inhibe ederken, ACE inhibitör peptitler ACE ile rekabet ederek çok daha farklı etkileşime girerler. ACE, küçük bir peptiti parçalayarak anjiyotensin-I'i anjiyotensin-II'ye dönüştürmektedir. ACE aslında anjiyotensin-I'e saldırmak yerine antihipertansif peptitlerle reaksiyona girer. Antihipertansif peptitler arter duvarlarını gevşetir ve anjiyotensin-II oluşumunu inhibe ederek sıvı hacmini azaltmaktadır. Bu nedenle, antihipertansif peptitler aslında kalp fonksiyonlarını iyileştirir ve kalbe, karaciğere ve böbreklere kan ve oksijen akışını artırır (Ahhmed ve Muguruma, 2010; Ngo vd., 2012). Birçok çalışma, C-terminalinde triptofan, tirozin, fenilalanin veya prolin ve N-terminalinde dallı zincirli alifatik amino asitlerin ACE'ye yarışmalı bir inhibitör olarak bağlanan bir peptit için uygun olduğunu göstermiştir (Li vd., 2004). Ayrıca, ACE inhibitör peptitlerin ortak özelliklerinden biri olarak N-terminalinin hidrofobikliği, inhibitör aktiviteye katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Rho vd., 2009). ACE inhibitör peptitler genellikle kısa zincirli peptitlerdir ve genellikle prolin gibi polar amino asit rezidüleri taşımaktadırlar. Dahası, ACE'nin çeşitli peptit inhibitörleri arasındaki yapı-aktivite ilişkileri, ACE'ye bağlanmanın substratın C-terminal tripeptit dizisinden güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermektedir ve bu pozisyonlarda hidrofobik amino asitler içeren peptitlerin güçlü inhibitörler olduğu öne sürülmektedir (Qian vd., 2007). ACE inhibitör aktivitesine sahip doğal peptit (bradikinin) (Ferreira vd., 1970) ve deniz peptininin (Oshima vd., 1979) ilk keşfinden bu yana, çeşitli deniz organizmalarının işleme atıkları, yumuşakçalar ve kabuklulardan elde edilen protein hidrolizatları ve bileşen peptitlerin *in vitro* olarak güçlü ACE inhibitör aktivitesi gösterdiği gösterilmiştir. Bunlar arasında yumuşakçalar olarak deniz tarağı, karides benzeri bir deniz salyangozu (kril), midye, istiridye ve karides proteinleri bulunmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012; Ngo vd., 2012; Pujiastuti vd., 2019). Bu nedenle, günümüzde hipertansiyonun önlenmesinde ve hafif hipertansif bireylerin başlangıç tedavisinde uygulanabilecek biyoaktif peptitlerin

elde edilmesine büyük ilgi gösterilmektedir. Örneğin bazı yumuşakçalar üzerinde yapılan bakıldığında, mavi midye (*Mytilus edulis*) ve istridye (*Crassostrea gigas*) fermente sosu, sırasıyla 19.34 ve 87.40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ *in vitro* IC₅₀ değerlerine sahip izole edilmiş peptitlerle potansiyel bir ACE inhibitör peptit kaynağı olarak gösterilmiştir (Je, Park, Jung, vd., 2005; Je, Park, Byun, vd., 2005). Bununla birlikte, ACE'nin *in vitro* inhibisyonu ve simüle edilmiş gastrointestinal sistemlerden elde edilen bilgiler, bir peptitin *in vivo* hipotansif bir ajan olarak hareket etme potansiyelinin yalnızca bir göstergesidir. Bir peptitin fizyolojik aktivite gösterebilmesi için gastrointestinal ve damarla ilgili sistemlerde bozunmaya ve modifikasyona direnmesi ve hedef bölgesine aktif bir biçimde ulaşması gerekmektedir. Bir peptitin antihipertansif etkisi ancak kapsamlı *in vivo* çalışmalarla güvenilir bir şekilde değerlendirilebilir (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Bu nedenle, yumuşakçalar dahil olmak üzere deniz organizmaları antihipertansif peptit kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmekte olup, gelecekte hipertansiyonun önlenmesi ve tedavisi için daha güvenli doğal inhibitörlerin belirlenmesine daha fazla odaklanılması gerekmektedir.

2.7.3. Antidiyabetik Aktivite

Tip-2 diyabet, insülin eksikliği veya direnci ile karakterize edilen bir durum olan bir şeker hastalığı türüdür. İnsülinin bağımsız olarak da adlandırılan bu diyabet formu insülin direnciyle ilişkilidir, fakat bu durum pankreasın insülin üretip salabileceği anlamına gelmektedir. Ancak bu süreç, verimsiz bir şekilde veya yetersiz miktarlarda gerçekleşmektedir. Buna karşılık, insüline bağımlı olarak da adlandırılan Tip-1 diyabette pankreas, insülin üretip salgılamamaktadır. Tip-2 diyabet, vakaların %95'inden fazlasını oluşturan iki türden daha yaygın olanıdır. Gelişmiş ülkelerde Tip-2 diyabet etki alanı artmaktadır. Bu durum, artan obezite ve sağlıksız yaşam tarzları ile ilişkilidir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2021 yılında açıkladığı verilerde; 10 yetiştikten 1'inin (537 milyon) diyabet hastası olduğu, küresel sağlık harcamalarının %12.5'inin diyabete harcandığı (966 milyar ABD Doları), 2045'de diyabetik yetişkinlerin sayısının 783 milyona ulaşacağı bildirilmiştir (IDF, 2021; Sun vd., 2022). Ülkemizde ise 2021 yılında 9 milyon diyabet hastasının bulunduğu, yetişkinlerde diyabet prevalansının %14.5 olduğu ve 2045 yılında 13.4 milyon yetişkin diyabet hastası olacağı tahmin edilmiştir (IDF, 2021; Sun vd., 2022). İnsülin eksikliğinden kaynaklanan hiperglisemi, kalp, böbrek ve ağız hastalıkları, görme kaybı ve sinir hasarı gibi komplikasyonlara yol açabilmektedir. Bugüne kadar, Tip-2

diyabetin yönetimi ve kontrolü, dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV), α -glukozidaz ve α -amilaz gibi enzimlerin inhibisyonunu hedeflemiştir. Bu enzimler, insülin biyosentezinin ve salgılanmasının uyarılması, glukagon salınımının azaltılması, iştahın ve genel olarak glukoz metabolizmasının yavaşlatılması ve ayrıca glukoz absorpsiyon hızı ile bağlantılıdır (Neves vd., 2016b). DPP-IV, iki inkretin hormonu olan glukoz bağımlı insülinotropik peptit (GIP) ve glukagon benzeri peptit-1'i (GLP-1) parçalamaktadır. Bu inkretinler, glikoz varlığında pankreas β -hücrelerinden insülin salgılanmasını artırır. DPP-IV'ün etkisini inhibe ederek, inkretin hormonları dolaşımda tutulur ve insülin üretimini kolaylaştırmaya devam eder (Nongonierma ve FitzGerald, 2013). DPP-IV enziminin, kandaki glukoz regülasyonunda yer alan inkretin hormonlarını indirmesinin; aşırı kilo alımı ve obezite ile başlayan tip-2 diyabetin gelişiminde temel faktör olduğu bilinmektedir. Diprotin A ve B, Sitagliptin, Vildagliptin ve Saxagliptin gibi DPP-IV inhibe edici aktiviteye sahip bazı sentetik ilaçlar, şu an Tip-2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Power vd., 2014). Ancak, baş ağrısı, mide bulantısı, deri ve mukozal enfeksiyon ve hatta pankreas kanseri gibi yan etkiler bu ilaçların kullanımıyla ilişkilendirilmiştir (Matveyenko vd., 2009; Neves vd., 2016b). Bu nedenle, DPP-IV inhibitörleri için doğal kaynakların kullanılması faydalı olabileceği bildirilmiştir. Deniz organizmalarında bulunan antidiyabetik peptitlerin çoğu balık türlerinden gelmektedir. Deniz organizmalarından elde edilen bazı protein hidrolizatlarının, 0.138 ile 1.200 mg ml⁻¹ arasında değişen IC₅₀ değerleri ile *in vitro* DPP-IV inhibe edici aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Harnedy ve FitzGerald, 2013b; Li-Chan vd., 2012; Neves vd., 2016a, 2016b). Ayrıca daha önceki araştırmalar, insanlarda kan glikoz seviyelerinin diyet proteini, protein hidrolizatları, peptitler ve amino asitler tarafından doğrudan ve/veya dolaylı mekanizmalar yoluyla faydalı bir şekilde düzenlenebileceğini göstermiştir (Oseguera-Toledo vd., 2014; Promintzer ve Krebs, 2006). Bununla birlikte, DPP-IV inhibitör peptitlerin bazı yapısal özellikleri tanımlanmıştır. Güçlü DPP-IV inhibitör peptitleri tipik olarak N-terminalinde sondan bir önceki amino asit olarak prolin veya alanin içeren iki ile yedi amino asit rezidüsü içermektedir. Peptitin amino asit bileşiminden ziyade diziliminin DPP-IV inhibitör aktivitesini etkilediği bildirilmiştir (Power vd., 2014). Protein ve protein hidrolizatlarının insülin üretimini etkileme gücü, sindirim sırasında oluşan peptitlerin ve amino asitlerin birincil dizilimine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebileceğini bildirmişlerdir (Harnedy vd., 2018a; Ranawana ve Kaur, 2013).

2.8. Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu ve Tanımlanması

Gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılacak olan hidrolizatların peptit boyutlarına göre karakterize edilmesi gerekmektedir, çünkü özellikle di ve tri-peptitler gibi düşük moleküler kütleli peptitlerin, daha yüksek biyofonksiyonel değere sahip olduğu bildirilmiştir (Fahmi vd., 2004; Gauthier vd., 1986; Vijaykrishnaraj ve Prabhasankar, 2015). 20'den fazla amino asit rezidüsüne sahip peptitlerin tekno-fonksiyonellikteki gelişmelerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Gauthier vd., 1986). Bu nedenle, protein hidrolizatlarını oluşturan peptitlerin ve amino asitlerin ayrıştırılması ve tanımlanması, bileşimleri hakkında daha iyi bilgi edinmek için çalışılmalıdır. Bu amaçla kullanılan yöntemler arasında, hidrofiliklik ve hidrofobiklik farklılıklarına dayalı olarak protein hidrolizatlarından peptitleri ayırmak için kullanılan ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) bulunmaktadır (Lemieux vd., 1991). Peptitlerin moleküler kütlelerine göre analizinde en yaygın kullanılan teknikler arasında jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yer almaktadır (Fekete vd., 2012). Ayrıca, peptitlerdeki amino asitlerin spesifik miktar tayini ve karakterizasyonu genel olarak HPLC-kütle spektrometresi (MS), HPLC-tandem kütle spektrometresi (MS/MS) veya ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) ile MS/MS kombinasyonu ile gerçekleştirilir (Dillen ve Cuyckens, 2013; Le Maux vd., 2015; Zhu ve FitzGerald, 2010).

Bir protein kaynağının fark edilebilir biyoaktiviteye sahip peptitler üretme potansiyelini değerlendirmek için, *in vitro* deneylerden önce ya da sonra *in silico* çalışmalar yapılabilir. *In silico* çalışmalar, bir proteinin belirli bir enzim tarafından hidrolize edildiğinde belirli bir biyolojik aktiviteyi serbest bırakma potansiyelini belirlemek için yararlı bir araç olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, peptidomik yaklaşımının bir parçası olarak bu çalışmaların dizi analizi sırasında kütle spektrometrisini optimize etmek için peptit boyutunu tahmin etmek için de kullanılabileceğini açıklanmıştır (Bechaux vd., 2019).

In silico çalışmalarını yönetmek için, farklı protein dizilerinde seçilen enzimlerle enzimatik hidrolizi simüle etmek için çevrimiçi veritabanları kullanılmıştır (Bechaux vd., 2019). Bilinen biyoaktif peptitler hakkında bilgi toplamak için CAMP, APD3, BIOPEP PepBank ve Cancer PPD gibi çeşitli açık kaynaklı veri tabanları oluşturulmuştur (Cunha ve Pintado, 2022; Whitaker vd., 2021). Günümüzde BIOPEP veri tabanı en yaygın kullanılan veri tabanıdır. Ayrıca, çok çeşitli ücretsiz veri tabanları

ve uygulamalar da mevcuttur ve genellikle bu tür *in silico* analizleri desteklemek için kullanılmaktadır. Örneğin, Peptide Cutter yazılımı, kullanılan her enzim için farklı kesim bölgeleri hakkında bilgi sağlayabilmektedir. PepBank, birkaç peptit tarafından sergilenebilecek potansiyel etkileşimler hakkında bilgi içeren bir peptit veritabanıdır. ProtParam, bir peptit veya protein dizisindeki amino asitlerin farklı oranlarını verebilen bir araçtır (Bechaux vd., 2019). Peptigram, MS/MS tarafından tespit edilen peptitlerin görselleştirilmesine ve karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Hem protein hem de peptit düzeyinde görselleştirmeler sağlayarak kullanıcıların kaynak proteinlerine eşlenen peptit dağılımlarını eşzamanlı olarak görselleştirmelerine olanak tanımaktadır. Örnekler arasında peptit kapsamı ve bolluğu açısından hızlı karşılaştırmalar yapılabilmektedir (Manguy vd., 2017). UniProt'un görevi ise, bilimsel topluluğa kapsamlı, yüksek kaliteli ve serbestçe erişilebilen bir protein dizisi ve fonksiyonel bilgi kaynağı sağlamaktır (Bechaux vd., 2019; Pundir vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) Fisher Scientific'ten (Dublin, İrlanda), hidroklorik asit, hekzan, HPLC saflık su, asetonitril ve Kjeldahl katalizör tabletleri VWR International'dan (Dublin, İrlanda), Alkalaz 2.4 L ve Flavourzyme 500 L Novo Nordisk'ten (Bagsvaerd, Danimarka), PDCAAS analiz kiti Megazyme'den (Bray, İrlanda), Mini-Protean TGX (%4-20) hazır poliakrilamid jeller ve Laemmli tamponu Bio-Rad Laboratories Inc.'den (CA, ABD), diğer tüm reaktifler ve enzimler (pepsin ve pankreatin dahil) Sigma-Aldrich'ten (Dublin, İrlanda), Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro, Abz-Gly-OH-HCl, H-Gly-Pro-7 amino-4-metil kumarin (AMC) ve Diprotin A Bachem Feinchemikalien'den (Bubendorf, İsviçre) temin edilmiştir. Tüm reaktifler analitik saflıktadır.

3.2. Limpet Homojenatının Hazırlanması

Limpetler (*P. vulgata*) İrlanda'nın County Clare şehrinin kuzeybatı kıyısındaki Lahinch sahilinden (52°55'51.9"N 9°20'47.9"W) toplanmıştır (Şekil 3.1., Kasım-2019). Limpetler 4 °C'de bir buz kutusuna yerleştirilmiş ve hemen laboratuvara transfer edilmiştir. Limpetlerin eti kabuğundan ayrılmış ve bir laboratuvar blenderi kullanılarak küçük parçalara ayrılmıştır. Kıyılmış limpet eti daha sonra -20 °C'de tek kullanımlık kaplarda saklanmıştır.



Şekil 3.1. Limpetlerin toplandığı konum

Küçük parçalara ayrılmış limpet eti oda sıcaklığında 1:10 (w/v) oranında distile su içinde süspanse edilmiş ve T25 Basic Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Almanya) homojenizatörü kullanılarak önce 13.000 rpm'de 2 dakika, ardından 16.000 rpm'de 30 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat daha sonra endojen enzim aktivitelerini inaktive etmek için bir su banyosu (WiseCircu tipi WCB, witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Almanya) kullanılarak 20 dakika boyunca 90 °C'de ısıtılmıştır. Homojenatlar daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve bir dondurarak kurutma sistemi (Labconco, Kansas City, ABD) kullanılarak dondurularak kurutulmuştur. Örnekler analizlerden önce -20 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Limpet homojenatının hazırlanması

3.3. Limpet Homojenatının Azot Çözünürlük Profili

Limpet protein homojenatlarının çözünürlük profili Kristinsson vd. (2005) tarafından açıklanan prosedüre göre analiz edilmiştir. Limpet protein homojenatları (400 mg) 1:20 (w/v) oranında dH₂O içinde süspanse edilmiş ve pH'ı, 0.5 M HCl ve 0.5 M NaOH kullanılarak 3.0 ile 12.0 arasındaki pH değerlerine ayarlanmıştır. Daha sonra pH'ı ayarlanmış çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca hafifçe karıştırılmıştır. Çözünür protein ekstraktları 4 °C'de ve 4000g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilmiştir (Hettich Universal 320R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya). Süpernatantlardaki protein içeriği Kjeldahl yöntemi kullanılarak (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, İsviçre) kullanılarak belirlenmiştir.

(IDF, 1993).

3.4. Limpet Protein Konsantresinin Hazırlanması

Limpet protein konsantresini (LPK) hazırlamak için izoelektrik çöktürme/pH shift yaklaşımı uygulanmıştır. Çözünürlük analizlerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, 2 g protein homojenatının 1:20 (w/v) oranında dH₂O içinde süspanse edilmiş ve pH'ı 0.5 M NaOH kullanılarak pH 8.0 (en yüksek çözünürlüğün olduğu pH)'a ayarlanmış ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra pH, 0.5 M HCl kullanılarak pH 4.0 [izoelektrik pH (pI)]'a ayarlanmıştır. Santrifüjlemeden (4000g, 4 °C, 15 dakika) sonra elde edilen çökelti (LPK) dH₂O [1:10 (w/v)] içinde yeniden süspanse edilmiş, dondurularak kurutulmuş ve bir sonraki kullanıma kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.5. Besin Bileşimi Analizleri

Örneklerin besin bileşim analizleri için nem (AOAC, 2005), kül (AOAC, 2005), ham protein (IDF, 1993) ve lipid (AOAC, 2005) içerikleri standart yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Nem içeriği, limpet eti ve homojenat için 65 °C'de bir fırında (Gallenkamp hotbox fırın, İngiltere) sabit ağırlıkta kurutma yoluyla belirlenmiştir. Ağırlık kaybı yüzdesi nem ölçüsü olarak kabul edilmiştir. Homojenat ve limpet etinin kül içeriği, 8.5 saat boyunca 550 °C'de bir kül fırınında (Nabertherm tip B180, Lilienthal, Almanya) yakılarak belirlenmiştir.

Homojenattaki ve LPK'deki toplam azot (TN) içeriği, yine Kjeldahl yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (IDF, 1993). Numunenin ham protein içeriği (%) bir azot-protein dönüşüm faktörü olarak 5.37 katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır (Diniz vd., 2014). Dupont vd. (2013)'ne göre homojenat ve LPK'nın protein azotunu (PN) ve protein olmayan azotunu (NPN) belirlemek için trikloroasetik asit (TCA) çökeltme yöntemi kullanılmıştır. Kısaca, 0.8 g numuneye [1:20 (w/v) dH₂O içinde çözölmüş] 3.2 ml TCA (%12 son konsantrasyon) eklenmiş ve proteinli bileşikler çökeltecek için 4 °C'de 3 saat karıştırılmıştır. Numune 4 °C'de 4000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. NPN içeren süpernatant ve PN içeren çökelti Kjeldahl yöntemi kullanılarak ayrı ayrı analiz edilmiştir.

Toplam lipid, 6 saat boyunca devridaim olacak şekilde bir Soxhlet aparatında hekzan (~68 °C) kullanılarak homojenat ve limpet etinden gravimetrik olarak ekstrakte edilmiş ve hesaplanmıştır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, çözücü bir

evaporatör (RE 100, Bibby Scientific, Staffordshire, UK) kullanılarak önceden tartılmış yuvarlak tabanlı bir şişede buharlaştırılmış ve toplam lipiti hesaplamak için ağırlık farkı kaydedilmiştir.

Karbonhidrat içeriği nem, protein, lipid ve kül içeriklerinin yüzdelерinin toplamının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

3.6. Protein Sindirilebilirliği ve Düzeltilmiş Amino Asit Skoru (PDCAAS) Belirleme

PDCAAS'nin hesaplanması için LPK'nın sindirimi, daha önce (Khalesi ve FitzGerald, 2021) tarafından açıklanan ve üreticinin (Megazyme, İrlanda) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 500 mg LPK, Megazyme protein standartları ve referans olarak kazein (Megazyme, İrlanda) 50 ml'lik santrifüj tüplerine tartılmıştır. Tüm örnekler 19 ml 0.06 N HCl içinde süspanse edilmiş ve ardından SI600 orbital inkübatör (Stuart, Staffordshire, Birleşik Krallık) kullanılarak 230 rpm'de çalkalanırken 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Her tüpe pepsin 1 ml (1 mg/ml süspansiyon, Megazyme) eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak tekrar inkübe edilmiştir (37 °C, 60 dakika, 230 rpm). Bu aşamanın sonunda pH, 1 M Tris-HCl kullanılarak 7.4'e ayarlanmıştır. Ardından her tüpe 200 µL tripsin/kimotripsin karışımı (1:1, Megazyme) (5 mg/ml) eklenmiş ve tüpler tekrar çalkalanarak inkübe edilmiştir (37 °C, 60 dk, 230 rpm). Daha sonra, enzimlerin inaktivasyonu 98 °C'deki su banyosunda 10 dakika tutularak gerçekleştirilmiştir. Numuneler oda sıcaklığında 20 dakika soğutulduktan sonra, her numuneden 4 ml, %40'lık TCA (1 ml) ile karıştırılmış ve numuneler 4 °C'de 16 saat saklanmıştır. Üst fazdan (çökelmemiş) 1.75 ml'lik numune alınmış ve santrifüj edilmiştir (15.000 g, 4 °C, 10 dakika). Daha sonra süpernatant toplanmıştır. Kör olarak, numune eklenmeden tüm reaktiflerin bir karışımı hazırlanmış ve benzer bir prosedür izlenmiştir. Tüm numunelerin süpernatantları, 1:19 (v/v) oranında seyreltilen kazein örneği hariç, 50 mM sodyum asetat (pH 5.5) kullanılarak 1:9 (v/v) oranında seyreltilmiştir.

3.6.1. Amin İçeriğinin Belirlenmesi

Tüm numunelerdeki amin içeriği kolorimetrik analiz ile belirlenmiştir (Khalesi ve FitzGerald, 2021). Kısaca, 100 µl numune 96 kuyucuklu bir mikrotitre plakasında 50 µl ninhidrin reaktifine (%2) eklenmiştir. Plaka daha sonra 70 °C ve 100 rpm'de 30 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika

soğutulduktan sonra her bir kuyucuğa 150 µl etanol (%50 v/v) eklenmiştir. Plaka bir mikropilaka okuyucuya (Bio-Tek Synergy HT, Winooski, VT, ABD) yerleştirildikten ve 30 °C'de 5 dakika çalkalandıktan sonra 570 nm'de absorbans ölçülmüştür. 50 mM sodyum asetat (pH 5.5) içinde çözülmüş L-glisinden (0-1 mM) oluşturulan standart grafik kullanılarak primer amin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.6.2. Amino Asit Analizi

LPK'nin AA kompozisyon analizi, Avrupa Komisyonu Yönetmeliği 152/2009 ile ilişkili yöntem kullanılarak harici bir firma (ALS Life Sciences, İrlanda) aracılığıyla hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir (Commission, 2009). Triptofan hariç tüm AA içeriği bir AA analiz cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Triptofan tayini için floresan saptamalı HPLC kullanılmıştır. AA bileşimi g/100 g protein olarak ifade edilmiştir.

3.6.3. PDCAAS'ın hesaplanması

Limpet protein konsantresindeki EAA'ların FAO (2011) tarafından önerilen EAA miktarlarına oranı, LPK'deki her EAA için üreticinin talimatlarına göre hesaplanmıştır (Megazyme). En düşük orana sahip EAA ilk sınırlayıcı EAA olarak kabul edilmiştir. PDCAAS değeri üreticinin talimatlarına göre aşağıda verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

Limpette bulunan AA'lar için düzeltilmi amin konsantrasyonu (mM)

$$= (\text{Limpetin birincil amin konsantrasyonu (mM)} + \left(\frac{4 \times \text{Pro}}{\text{Lys}}\right) + (2 \times \text{His}) + (2 \times \text{Arg}))$$

In vitro sindirilebilirlik

$$= \frac{((\text{çizginin eğimi} \times \text{her numune için düzeltilmiş birincil amin konsantrasyonu}) + \text{kesişme noktası})}{100}$$

$$\text{Esansiyel AA'lerin oranı} = \left(\frac{\text{mg AA}}{\text{numunedeki g protein}}\right) / \left(\frac{\text{mg AA}}{\text{referans numunedeki g protein}}\right)$$

$$\text{PDCAAS} = \text{in vitro sindirilebilirlik} \times \text{sınırlayıcı EAA oranı}$$

3.7. Protein Hidrolizatlarının Oluşturulması

3.7.1. Enzimatik Hidroliz

Limpet protein konsantresi (3 g) ilk olarak 60 ml distile su içinde 1:20 (w/v) oranında süspanse edilmiştir. Alkalaz veya Flavourzyme hidrolizi %1 (v/w protein)

E:S oranında, pH 7.0 ve 50 °C'de gerçekleştirilmiştir. Hidroliz her iki enzim için de aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hidroliz karışımının pH değeri, bir pH stat (Titrando 842 ve 902, Metrohm, Dublin, İrlanda) kullanılarak 0.5 M NaOH ile hidroliz sırasında pH 7.0'da tutulmuştur. Hidroliz 4 saat boyunca sürdürülmüş ve farklı zaman aralıklarında (0, 30, 60, 120, 180 ve 240. dakika) hidrolizatlardan numuneler alınmıştır. Tüm hidrolizat çözeltileri daha sonra enzimi inaktive etmek için 20 dakika boyunca 80 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, elde edilen limpet protein hidrolizatları -20 °C'de saklanmıştır.

LPK, gastrointestinal gıda sindiriminin statik *in vitro* simülasyonu (INFOGEST) protokolüne göre sindirilmiştir (Atallah vd., 2020; Brodkorb vd., 2019). 8 mL sulandırılmış LPK [%6 (w/v) protein] pH 7.0'da 2 dakika boyunca 8 ml simüle tükürük sıvısı ile karıştırılmıştır. Ancak, gastrointestinal geçiş sırasında protein sindirimi üzerindeki etkinin incelenmesi istendiği için bu *in vitro* sindirim deneyinde α -amilaz kullanılmamıştır. Karışım daha sonra 16 ml simüle gastrik sıvı kullanılarak seyreltilmiştir. Daha sonra bu karışıma pepsin (2000 U/ml) eklenmiştir. Örnek 37 °C'de 120 dakika boyunca pH 3.0'da inkübe edilmiştir. Bu aşamanın sonunda pH 7.0'a ayarlanmıştır. Numunenin bir sıvı bölüntüsü (12 ml) pepsin inaktivasyonu için 90 °C'de 10 dakika ısıtılırken, gastrik olarak sindirilmiş numunenin 20 ml'si daha sonra bağırsak sindirimi aşaması için kullanılmıştır. Bu noktada, 20 ml simüle bağırsak sıvısı ve pankreatin (27.3 U/mL tripsin aktivitesi) bu örneğe eklenmiştir. Numune 37 °C'de 120 dakika boyunca pH 7.0'da inkübe edilmiştir. Bağırsak fazının sonunda numuneler 90 °C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Numuneler daha sonraki analizler öncesinde dondurularak kurutulmuştur.

3.7.2. INFOGEST Yöntemi Kullanılarak *in vitro* Gastrointestinal Sindirim

LPK, gastrointestinal gıda sindiriminin statik *in vitro* simülasyonu (INFOGEST) protokolüne göre sindirilmiştir (Atallah vd., 2020; Brodkorb vd., 2019). 8 mL sulandırılmış LPK [%6 (w/v) protein] pH 7.0'da 2 dakika boyunca 8 ml simüle tükürük sıvısı ile karıştırılmıştır. Ancak, gastrointestinal geçiş sırasında protein sindirimi üzerindeki etkinin incelenmesi istendiği için bu *in vitro* sindirim deneyinde α -amilaz kullanılmamıştır. Karışım daha sonra 16 ml simüle gastrik sıvı kullanılarak seyreltilmiştir. Daha sonra bu karışıma pepsin (2000 U/ml) eklenmiştir. Örnek 37 °C'de 120 dakika boyunca pH 3.0'da inkübe edilmiştir. Bu aşamanın sonunda pH 7.0'a ayarlanmıştır. Numunenin bir sıvı bölüntüsü (12 ml) pepsin inaktivasyonu için 90

°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edilirken, gastrik olarak sindirilmiş numunenin 20 ml'si daha sonra bağırsak sindirimi aşaması için kullanılmıştır. Bu noktada, 20 ml simüle bağırsak sıvısı ve pankreatin (27.3 U/mL tripsin aktivitesi) bu örneğe eklenmiştir. Numune 37 °C'de 120 dakika boyunca pH 7.0'da inkübe edilmiştir. Bağırsak fazının sonunda numuneler 90 °C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Numuneler daha sonraki analizler öncesinde dondurularak kurutulmuştur.

3.8. Hidroliz Derecesinin Ölçülmesi

In vitro gastrik ve gastrointestinal sindirilmiş LPK örneklerinin ve ayrıca Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak oluşturulan hidrolizatların hidroliz derecesi TNBS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Harnedy vd., 2018b). Örnekler [%5 (w/v) protein] %0,1 (w/v) protein konsantrasyonuna ulaşmak için %1 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) ile seyreltilmiş, ardından 1 saat boyunca 50 °C'de ön ısıtma yapılmıştır. 1:1 oranında su ve sodyum fosfat tampon çözeltisi (0.2125 M, pH 8.2) kullanılarak %5 (w/v) TNBS stok çözeltisi %0.5'e (w/v) seyreltilmiştir. Her örnekten 10 µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitre plakasına eklenmiştir. Ardından, her bir kuyucuğa 160 µl %0.5 (w/v) TNBS eklenmiştir. Absorbans, bir mikrolaka okuyucu kullanılarak $\lambda = 350$ nm ve 50 °C'de 1 saat boyunca her 5 dakikada bir kaydedilmiştir. Numunelerin serbest amino grubu içeriği (AN, mg N/mg numune) standart olarak lösin (0, 2, 5, 7, 14, 21, 28 ve 56 mg/ml) kullanılarak belirlenmiştir. Limpet proteini için peptit bağlarının nitrogen içeriği (Npb) için literatürde bir değer bulunmadığından, % hidroliz derecesini tahmin etmek için deniz organizmaları için kullanılan Npb değeri olan 123.3 mg/g protein kullanılmıştır (Egerton vd., 2018; Wang vd., 2016).

3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

LPK, *in vitro* gastrik ve gastrointestinal sindirilmiş örneklerin ve ayrıca Alkalaz ve Flavourzyme enzimleriyle üretilen limpet protein hidrolizatların SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) protein profilleri Laemmli (1970)'ye göre bir Mini-Protean Tetra Cell sistemi (Bio-Rad, Hemel Hempstead, İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Kısaca, 6 mg LPC 1 ml dH₂O içinde çözülmüş ve yükleme tamponu [1 ml 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 ml %10 SDS, 0.25 mL β - merkaptotanol, 2 ml gliserol, 2 ml %1 (w/v) bromofenol mavisi ve 0.75 ml dH₂O] ile 1:1 oranında karıştırılmış ve ardından 95 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Protein ayırıştırma işlemi Mini-Protean TGX hazır jeller (%4-20 akrilamid çözücü jel) kullanılarak 90 dakika boyunca 100 V sabit

voltajda dikey elektroforez ünitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein konsantresi ve sindirilmiş örnekler (10 µl) her bir kuyucuğa yüklenmiştir. Standart proteinlerin bir karışımı [SigmaMarker wide range (6.5- 200 kDa)] moleküler ağırlık (MW) belirteci olarak kullanılmıştır. Jeli boyamak için 45 dakika boyunca Coomassie Blue R-250 çözeltisi kullanılmış ve ardından %10 (v/v) asetik asit ve %10 (v/v) metanol içeren sulu bir çözelti içinde çalkalamalı bir platform üzerinde boyadan arındırılmıştır.

3.10. Jel Geçirgenlik-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

LPK, *in vitro* sindirilmiş örneklerinin, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleriyle oluşturulan protein hidrolizatlarının moleküler kütle dağılım profilleri Spellman vd. (2009) tarafından açıklanan yöntemle göre jel geçirgenlik-yüksek performanslı sıvı kromatografi (GP-HPLC) sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler %0.1 (v/v) trifloroasetik asit (TFA) içeren %30 asetonitril (ACN) içinde %0.25 [(w/v) protein] oranında seyreltilmiş ve ardından 0.2 µm politetrafloroetilen şırınga filtrelerinden (VWR, Dublin, İrlanda) süzülmüştür. Ayırma işlemi, 0.5 mL/dak akış hızında H₂O içinde %0.1 (v/v) TFA ve %30 (v/v) asetonitril kullanılarak izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. GP-HPLC kromatogramlarının moleküler kütle dağılım profillerinin belirlenmesi için standart proteinlerin ve peptitlerin (sığır serum albümini, β-laktoglobülin, α-laktalbümin, aprotinin, basitrasin, Leu-Trp-Met-Arg ve Asp-Glu) ortalama alıkonma sürelerinden bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

3.11. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)

Alkalaz ve Flavourzyme ezimleri kullanılarak üretilen limpet protein hidrolizatlarının peptit profilleri, daha önce Nongonierna ve FitzGerald (2012) tarafından tarif edildiği gibi ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC Acquity - Waters, Milford, MA, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Kromatografi için kullanılacak olan mobil faz A, HPLC saflığında olan su içinde %0.1 (v/v) TFA'dan ve mobil faz B ise %80 HPLC saflığındaki ACN içinde %0.1 (v/v) TFA'dan oluşmaktadır. Örnekler mobil faz A'da süspanse edilmiş (%0.5 w protein eşdeğeri/v) ve 0.2 µm selüloz asetat filtrelerle süzülmüştür. Akış hızı 0.3 ml dk⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Ayırıştırıcının absorbansı 214 nm'de izlenmiştir.

3.12. Biyoaktivite Analizleri

3.12.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesinin Belirlenmesi

Oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORAC) analizi Cermeño vd. (2016) tarafından tarif edildiği gibi bir plaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktifler, LPC ve *in vitro* gastrointestinal sindirilmiş örnekler ve ayrıca Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak elde edilen protein hidrolizatları sodyum fosfat tamponunda (0.075 M, pH 7.0) hazırlanmıştır. 50 µl örnek (0.2 mg ml⁻¹), kör (fosfat tamponu) veya standarttan (0 - 100 µM Troloks, R² = 0.9951) alınarak 96 kuyucuklu bir mikropalakaya pipetlenmiş, 50 µl fluorescein (0.78 µM) ile karıştırılmış ve 37 °C'de 15 dakika ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak elde edilen limpet protein hidrolizatları bu analiz için son konsantrasyonu 0.1 mg ml⁻¹ olarak kullanılmıştır. Reaksiyon, her bir kuyucuğa 25 µl 0.221 M 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid eklenerek başlatılmıştır. Işıma (uyarım: 458 nm, emisyon: 520 nm) 120 dakika boyunca her 5 dakikada bir kaydedilmiştir. Sonuçlar µM Troloks eşdeğeri (TE) g⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

3.12.2. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) (ABTS^{•+}) Radikal İndirgeme Aktivitesinin Belirlenmesi

LPK, *in vitro* gastrointestinal sindirilmiş örneklerinin, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak üretilen limpet protein hidrolizatlarının 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate) (ABTS^{•+}) radikal giderme aktiviteleri Kleekayai vd. (2015) tarafından tarif edildiği şekilde ölçülmüştür. ABTS^{•+} stok çözeltisi 2.45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ile 7 mM ABTS (1:2, v/v) karıştırılarak hazırlanmıştır. Radikallerin oluşması için bu çözelti en az 16 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından ABTS^{•+} stok çözeltisi 5 mM fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak 734 nm'de 0.70 ± 0.02 absorbands değerine kadar seyreltilmiştir. 10 µl örnek (4.0 mg ml⁻¹), blank (tampon) veya Troloks standardı ve 200 µL ABTS^{•+} radikal çözeltisinden oluşan toplam 210 µl reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu bir mikropalakada hazırlanmıştır. Ek olarak, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak üretilen limpet protein hidrolizatları bu analiz için son konsantrasyonu 1.0 mg ml⁻¹ olacak şekilde kullanılmıştır. Plaka 5 dakika boyunca ışıktan korunmuş ve ardından absorbands bir mikropalaka okuyucu kullanılarak 734 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar µM TE g⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

3.12.3. Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Aktivitesinin Belirlenmesi

LPK, *in vitro* gastrointestinal sindirilmiş örneklerinin ve Alkalaz ve Flavourzyme kullanılarak elde edilen limpet protein hidrolizatlarının demir iyonu

indirgeyici antioksidan güç (FRAP) aktivitesi Cermeño vd. (2016) tarafından tarif edildiği gibi belirlenmiştir. 2 mg ml⁻¹'deki örnekler (20 µl) 96 kuyucuklu bir mikrolakaya eklenmiş ve ardından 150 µl FRAP reaktifi [10:1:1 oranında 0.3 M asetat tamponu (pH 3.6), 0.01 M 2,4,6-tripiridil-s-triazin ve 0.02 M FeCl₃-6H₂O] eklenmiştir. Plaka 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve absorbans Synergy HT plaka okuyucu kullanılarak 590 nm'de ölçülmüştür. 0-150 µM konsantrasyon aralığında bir standart Troloks eğrisi hazırlanmıştır. Sonuçlar µM TE g⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

3.12.4. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitör Aktivitesinin Belirlenmesi

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesinin inhibisyonu LPK, *in vitro* gastrointestinal sindirilmiş örnekleri ve Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak oluşturulan limpet protein hidrolizatları için Cermeño vd. (2018)'nin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Özetle, nihai konsantrasyonu 0.2 mg/ml olan her bir örnekten 50 µl alınarak 50 µl analiz tamponu (100 mM sodyum borat tamponu, 300 mM NaCl, pH 8.3), 200 µl substrat [0.45 mM Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro] ve 50 µl ACE'den (8 mU/ml) oluşan ortama eklenmiştir. Reaksiyon, ACE'nin etkisiyle substrat olarak kullanılan Abz-Gly-Phe-(NO₂)-Pro'dan ışımayı sağlayan ürün Abz-Gly'nin salınmasıyla izlenmiştir. Bir birim ACE aktivitesi (U) 37°C'de dakikada 1 µM Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro'yu hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Referans pozitif kontrol olarak kaptopril (30 nM) kullanılmış ve sonuçlar ACE inhibisyonunun yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.12.5. Dipeptidil peptidaz (DPP)-IV inhibitör aktivitesi

Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak elde edilen limpet protein hidrolizatlarının DPP-IV inhibitör aktivite deneyi bazı modifikasyonlarla Harnedy ve FitzGerald (2013b) tarafından açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. 10 µl limpet protein hidrolizat örnekleri (2 mg ml⁻¹ protein), 30 µl 0.10 M Tris-HCl tampon (pH 8.0) ve 50 µl 200 µM H-Gly-Pro-AMC ile karıştırılmıştır. 37 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından reaksiyon 10 µl DPP-IV (4 mU ml⁻¹) eklenerek başlatılmıştır. Floresandaki değişim, sırasıyla 360 ve 460 nm uyarma ve emisyon dalga boylarına ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu kullanılarak 30 dakikalık bir süre boyunca izlenmiştir. Bir birim (U) DPP-IV (domuz böbreği DPP-IV) aktivitesi, 37 °C'de 1 µmol H-Gly-Pro-AMC min⁻¹ hidrolizi için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Diprotin A (Ile-Pro-Ile), 5 µM nihai konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.13. LC-MS/MS ile Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi

LPK'dan elde edilen *in vitro* gastrointestinal sindirimlerindeki peptit tanımlama analizleri daha önce O'Keeffe vd. (2017) ve Cermeño vd. (2022) tarafından açıklanan yöntem kullanılarak bir Bruker micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile birleştirilmiş bir ACQUITY UPLC sistemi (Waters) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hidrolizat örnekleri mobil faz A'da (%0.1 (v/v) formik asit (FA) içeren MS suyu) 0.1 mg mL⁻¹ nihai konsantrasyona seyreltilmiş ve bir Acquity BEH 300 C18 kolonunda (2.1 × 50 mm, 1.7 µm; Waters, Dublin, İrlanda) ayrılmıştır. Ayırma, 53 dakika boyunca 0.2 ml dk⁻¹ akış hızında mobil faz B'nin (%0.1 (v/v) formik asit ile %80 (v/v) asetronitril) %0'ından %80'ine kadar doğrusal gradyan elüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrosprey koşulları şu şekildedir: kapiler voltaj 4500 V; kapiler sıcaklık, 220 °C; kuru gaz (N₂) akışı, 8.0 L/dak; nebulizör, 1.8 bar; çarpışma enerjisi 7 eV; çarpışma hücresi radyo frekansı (RF) 1500 Vpp ve transfer süresi 100 µs'dir. MS ve tandem MS taramaları 100-2500 ve 50-650 m/z aralığında pozitif pozisyonda gerçekleştirilmiştir. Sistem bir ESI düşük moleküler kütle ayar karışımı kalibrantı (Agilent Technologies, CA, ABD) ile kalibre edilmiştir. Peptit tanımlaması için MS/MS verileri Peaks Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Ontario, Kanada) kullanılarak Uniprot veri tabanından elde edilen *P. vulgata*, *Mytilus edulis* (mavi midye), *Lottia gigantea* (dev baykuş limpet), *Mizuhopecten yessoensis* (deniz tarağı) ve *Mytilus coruscus* (Kore midyesi) gibi çeşitli türlerin proteomları kullanılarak kurum içi bir veri tabanına karşı analiz edilmiştir. Hata öncül kütlesi 0.5 Da, parça iyonu 0.05 Da ve yanlış keşif oranı %1 olarak ayarlanmıştır. *De novo* olarak elde edilen peptit dizileri daha sonra Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve Peaks kullanılarak manuel olarak doğrulanmıştır. Venn diyagramları InteractiVenn (Heberle vd., 2015) web aracı kullanılarak, peptigramlar ise Peptigram Bioware programı kullanılarak elde edilmiştir.

3.14. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç tekrar olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak rapor edilmiştir. Windows için Minitab 15 ve GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, ABD) istatistik programı kullanılarak önemli farklılıkları test etmek için tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey post hoc karşılaştırma testi yapılmıştır. <0.05 p-değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Limpet Homojenatının Besin Bileşimi

Genel olarak, *P. vulgata*'nın kıyılmış limpet etinin temel besin bileşimi 82.06 ± 0.86 nem, 10.23 ± 0.36 protein, 1.14 ± 0.38 lipit ve 2.15 ± 0.06 kül içermekte olup, geri kalan 5.65 ± 0.80 karbohidrata karşılık gelmektedir (Tablo 4.1.). Farklı bir limpet türü (*P. caerulea*) üzerinde yapılan besin bileşimi çalışmasında limpet etinde hemen hemen aynı miktarlarda nem (78.0 ± 4.5), protein (9.2 ± 1.0), kül (2.6 ± 0.3) ve lipit (2.4 ± 0.2) değerleri bildirilmiştir (Zlatanov vd., 2009). Limpet etinden elde edilen homojenat 2.63 ± 0.36 nem, 7.75 ± 0.35 lipit, 12.86 ± 0.58 kül, 46.76 ± 0.91 ham protein ve 26.17 ± 4.01 karbohidrat içermektedir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Limpet eti, homojenat ve limpet protein konsantrasyonunun temel besin bileşimi

	Limpet eti	Homojenat	LPK
Nem (% (w/w))	82.06 ± 0.86	2.63 ± 0.36	-
Lipit (% (w/w))	1.14 ± 0.38	7.75 ± 0.35	-
Kül (% (w/w))	2.15 ± 0.06	12.86 ± 0.58	-
Ham protein (% (w/w))	10.23 ± 0.36	46.76 ± 0.91^a	66.01 ± 1.67^b
Karbohidrat (% (w/w))	5.65 ± 0.80	26.17 ± 4.01	-
Toplam azot (% dw)	1.91 ± 0.07	10.20 ± 0.43^a	12.64 ± 0.08^b
Protein olmayan azot (% dw)	-	0.98 ± 1.61^a	0.33 ± 0.01^b
Protein azot (% dw)	-	8.77 ± 0.16^a	12.29 ± 0.22^b

Değerler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak ifade edilir, ^aher satır için homojenat ve LPK değerleri arasındaki istatistiksel olarak önemli farklılıkları gösterir ($p < 0.05$)

Fernandes vd. (2019) Madeira Takımadaları'ndaki (Portekiz) farklı toplama alanlarından alınan iki farklı limpet türü (*Patella aspera* ve *Patella candei*) üzerinde yaptıkları çalışmalarda limpet eti homojenatlarında 7.71 ile 12.60 (dw) arasında lipit, 11.21 ile 23.12 (dw) arasında kuru madde, 48.22 ile 64.09 (dw) arasında protein ve 7.86 ile 23.07 (dw) arasında karbohidrat içerikleri rapor etmişlerdir. Benzer sonuçlar Dare ve Edwards (1975) tarafından midyeler üzerinde yapılan çalışmalar sırasında da rapor edilmiştir. *M. edulis* etinin besin bileşiminin mevsimsel olarak değişkenliğini belirlemek için yaptıkları çalışmada, kuru ağırlık bazında yaklaşık 58.7 (46.4 - 73.1) protein, 22.5 (4.1 - 36.7) karbonhidrat, 7 (3.9 - 9.6) lipit ve 11.8 (8.8 - 17.2) kül içerdiğini bildirmişler, parantez içinde verilen sayılar mevsimsel uç değerleri içermektedir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında elde

edilen sonuçlar önceki çalışmalarda bildirilenlerle uyumludur. Ayrıca, buradaki sonuçlar istiridye ve diğer limpet türleri gibi diğer deniz yumuşakçaları ile karşılaştırılabilir bir besin bileşim profili göstermiştir (Fernandes vd., 2019; Linehan vd., 1999).

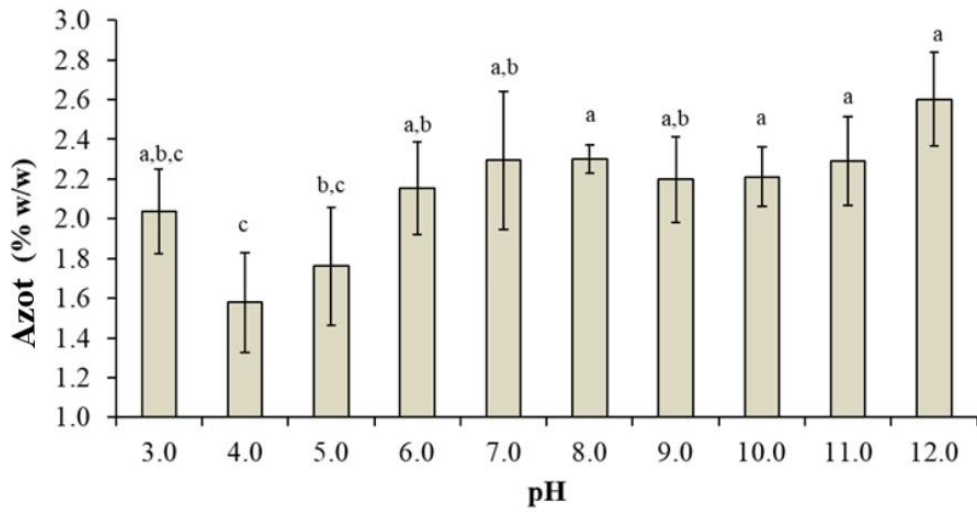
4.2. Limpet Protein Konsantrasyonunun Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu

4.2.1. Azot Çözünürlüğü

Homojenatın protein içeriğini artırmak için bir izoelektrik çöktürme ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deniz proteinlerinin ekstraksiyonu ve izolasyonu için yaygın olarak kullanılan izoelektrik çöktürme yöntemi, proteinlerin asidik veya alkali bir çözelti kullanılarak çözünürleştirilmesini ve ardından pI değerinde çöktürülmesini içerir (Marmon ve Undeland, 2010; Neves vd., 2017). Bu yöntem, çeşitli düşük değerli balıklardan, balık yan ürünlerinden ve balık işleme atıklarından proteinleri izole etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kristinsson ve Liang, 2006; Marmon ve Undeland, 2010; Surasani, 2018) ve ayrıca tatlı su midyesi *Lamellidens marginalis* (Surasani vd., 2018), mavi midye *M. edulis* (Vareltzis ve Undeland, 2012) ve üçgen kabuklu inci midyesi *Hyriopsis cumingii* (Liu vd., 2009) gibi yumuşakçalara da uygulanmıştır. Ancak, bildiğimiz kadarıyla, bu işlemle limpet eti proteinlerinin azot çözünürlüğü hakkında daha önce herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir.

İzoelektrik çöktürme işlemi için uygun koşulları belirlemek amacıyla limpet homojenatının azot çözünürlük profili elde edilmiştir (Şekil 4.1.). Limpet homojenatının başlangıç pH değeri 7.15 ± 0.03 olarak belirlenmiştir. Homojenat 3.0-12.0 aralığında farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Elde edilen veriler tüm limpet proteinlerinin asidik ve alkali pH bölgelerinde değişken çözünürlüğe sahip olduğunu göstermiştir. Proteinlerin zayıf asidik ve bazik yan zincir grupları üzerindeki yük, çözeltinin pH'ından etkilenmektedir. Sonuç olarak, proteinler pI değerlerinde en düşük çözünürlüğe sahiptir ve proteinlerin en yüksek çözünürlüğü en çok yüklü olduğunda elde edilmektedir (Giménez vd., 2009). Limpet azotlu bileşenlerinin en düşük olduğu çözünürlüğü, pI değerini gösteren pH 4.0'da gözlenirken, pH 12.0'da en yüksek çözünürlük gözlenmiştir. Azot çözünürlüğü değerlerinde pH 8.0 ve 12.0 arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$) ve bu nedenle, pH 4.0'dan pH 12.0'a ayarlamak için gereken yüksek NaOH miktarları ve ayrıca süreç maliyeti nedeniyle pH 12.0'ın endüstri açısından uygun olmadığı düşünüldüğünden, maksimum

çözünürlük değeri olarak pH 8.0 kullanılmıştır. Benzer bulgular Liu vd. (2009) tarafından inci midyesi eti protein izolatlarının protein çözünürlük analizi sırasında da rapor edilmiştir. pH 11.0 ve 5.0 sırasıyla en yüksek çözünürlük ve pI değerlerine karşılık gelmektedir. Surasani vd. (2018), tatlı su midyesi proteini için en yüksek çözünürlüğün pH 13.0'da olduğunu, en düşük protein çözünürlüğünün ise pH 4.0 ve 5.0'da gözlemlendiğini bildirmiştir. Benzer sonuçlar Vareltzis ve Undeland (2012) tarafından mavi midyeler üzerinde yapılan çalışmalar sırasında da rapor edilmiştir. Mavi midyelerin asidik (pH 2.6) ve alkali (pH 12.0) çözeltiyle işlenmesi sırasında sırasıyla %43.0 ve %58.0'lık bir geri kazanım verimliliği ve 5.8 ve 5.2'lik pI değerleri bildirmişlerdir.



Şekil 4.1. Limpet homojenatının azot çözünürlük profili

Böylece limpet protein konsantresi, çözünürlük analizinden elde edilen değerlere göre, yani pH 8.0'da çözünürlleştirme ve pH 4.0'da çöktürme olmak üzere izoelektrik çöktürme yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyonun ardından, limpet protein konsantresindeki protein içeriği $66.01 \pm 1.67\%$ 'ye yükselmiştir (Tablo 4.1.). Benzer şekilde, Zheng vd. (2021) tarafından deniz yumuşakçaları ve kabukluları üzerinde yapılan bir çalışmada, izoelektrik çöktürme yaklaşımı kullanılarak elde edilen istiridye (*Crassostrea hongkongensis*) ve karides (*Euphausia superba*) protein izolatlarının protein içerikleri sırasıyla kuru ağırlık bazında $67.42 \pm 0.65\%$ ve $54.27 \pm 0.25\%$ olarak bildirilmiştir. Ancak yazarlar bu çalışmada kullanılan azot-protein dönüşüm faktörünü vermemiştir. Bu tez çalışmasında, Diniz vd. (2014) tarafından yumuşakçalar için bildirilen azot-protein dönüşüm faktörü (5.37) kullanılmıştır.

Homojenat ve limpet protein konsantresinde TN, NPN ve PN tayini sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Limpet protein konsantresinde kuru ağırlık üzerinden ölçülen TN ve PN içeriği (sırasıyla 12.64 ± 0.08 ve 12.29 ± 0.22) homojenatta elde edilen değerlerden (sırasıyla 10.20 ± 0.43 ve 8.77 ± 0.16) daha yüksektir (Tablo 4.1.). Bununla birlikte, limpet protein konsantresindeki NPN içeriği (0.33 ± 0.01) homojenattan (0.98 ± 1.61) daha düşüktü, bu da izolasyon işlemi sırasında protein olmayan bileşenlerin uzaklaştırıldığını göstermektedir.

4.2.2. Limpet Protein Konsantresinin AA Bileşimi ve PDCAAS

Limpet protein konsantresinin AA bileşimi Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Protein konsantresinin toplam AA içeriği 77.25 g/100 g'dır. Protein konsantresinde en çok bulunan AA'lar sırasıyla 11.6, 8.88 ve 7.81 g/100 g protein oluşturan Glu, Asp ve Arg'dir. EAA (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Cys ve Tyr) içeriği 31.73 g/100 g protein olup toplam AA'ların %41.07'sini oluşturmuştur. Bildiğimiz kadarıyla, daha önce hiçbir çalışma limpet protein konsantresinde bulunan AA bileşimini rapor etmemiştir. Bununla birlikte, bu tez çalışmasında bildirilen limpet protein konsantresindeki AA içeriği, diğer deniz yumuşakçalarının, örneğin inci midyesi protein izolatının (65.73 g/100 g) AA içeriğinden daha yüksektir (Liu vd., 2009). Buna ek olarak, limpet protein konsantresinin EAA içeriği, istiridye protein izolatı (47 ± 1) ve karides protein izolatı (50.9 ± 0.9) gibi diğer yumuşakça ve kabuklu örnekleri için bildirilenlerden sayısal olarak daha düşüktür (Zheng vd., 2021).

Tablo 4.2. Limpet protein konsantresinin toplam amino asit bileşimi

Amino asitler	İçerik (g 100 g ⁻¹ LPK)	Amino asitler	İçerik (g 100 g ⁻¹ LPK)
Triptofan (Trp-W)*	0.69	Prolin (Pro-P)	3.28
Aspartik asit (Asp-D)	8.88	Sistein (Cys-C)*	0.89
Serin (Ser-S)	4.25	Tirozin (Tyr-Y)*	2.55
Glutamik asit (Glu-E)	11.6	Valin (Val-V)*	3.38
Glisin (Gly-G)	5.14	Metiyonin (Met-M)*	1.64
Histidin (His-H)*	1.42	Lizin (Lys-K)*	5.41
Arjinin (Arg-R)	7.81	İzolösin (Ile-I)*	3.36
Treonin (Thr-T)*	4.00	Lösin (Leu-L)*	5.74
Alanin (Ala-A)	4.56	Fenilalanin (Phe-F)*	2.65

*Esansiyel amino asitler

Protein sindirilebilirliği, proteinlerin besinsel kalitesini etkilemektedir. Protein kalitesini değerlendirmek için umut verici bir yöntem PDCAAS'ın tahminidir (FAO/WHO, 1991; Schaafsma, 2000). PDCAAS, protein kaynağındaki ilk sınırlayıcı EAA'nın belirlenmesi ile gerçekleştirilmektedir ve okul öncesi çağıdaki bir çocuğun gereksinimlerine dayalı olarak referans bir protein kaynağındaki aynı AA içeriğinin yüzdesi olarak ifade edilmektedir (Bleakley, 2018; FAO/WHO, 1991). PDCAAS değerini hesaplamak için kullanılan EAA verileri Tablo 4.3.'te sunulmuştur. Limpet protein konsantresinin ilk sınırlayıcı EAA'sı 0.950 EAA oranı ile triptofandır. Limpet protein konsantresi için PDCAAS ve *in vitro* sindirilebilirlik değerleri sırasıyla 1.01 ± 0.01 ve 1.06 ± 0.01 olarak hesaplanmıştır. PDCAAS değeri 1.0 olan proteinler, popülasyon için EAA gereksinimlerini karşılayan yüksek kaliteli veya tam proteinler olarak kabul edilmektedir (Abdul-Hamid vd., 2002). Limpet protein konsantresi için bu PDCAAS sonuçları karides (1.0) ve kril (karides benzeri bir deniz canlısı) (1.0) ile karşılaştırılabilir düzeydedir ve kurutulmuş deniz kulağı protein izolatlarından (0.91 ± 0.01) daha yüksektir (Cepero-Betancourt vd., 2017; Dayal vd., 2013; Gigliotti vd., 2008).

Tablo 4.3. 2-5 yaş arası bir çocuğun amino asit gereksinimleri ile karşılaştırıldığında LPK'nın EAA bileşimi

Esansiyel Amino asit (EAA)	EAA içeriği (mg/g protein konsantresi)	EAA (mg/g protein) ^a	Referans değerler ^b (mg/g protein)	EAA oranı ^c
Sistein + Metiyonin	25.3	38.33	25.00	1.533
Triptofan	6.9	10.45	11.00	0.950
Treonin	40.0	60.60	34.00	1.782
Valin	33.8	51.20	35.00	1.463
İzolösin	33.6	50.90	28.00	1.818
Lösin	57.4	86.96	66.00	1.318
Tirozin + Fenilalanin	52.0	78.78	63.00	1.250
Lizin	54.1	81.96	58.00	1.413
Histidin	14.2	21.51	19.00	1.132

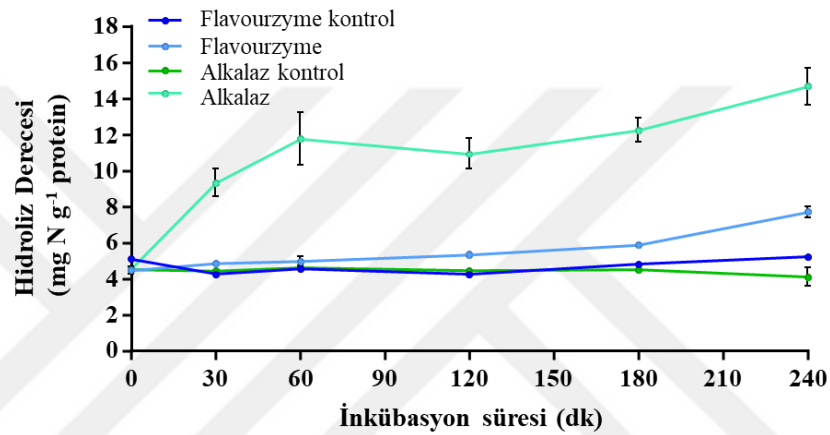
^a %66.01 protein içeren LPK'nın mg/g protein cinsinden EAA içeriğini temsil etmektedir, ^b (FAO/WHO, 1991) tarafından bildirilen 2-5 yaş arası çocukların amino asit gereksinimine dayalı referans değerleri,

^c EAA oranı = EAA (mg/g protein) / 2-5 yaş referans değeri

4.2.3. Limpet Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi

4.2.3.1. Enzimatik Protein Hidrolizatları

Hidroliz derecesi genellikle bir proteoliz izleme parametresi olarak kullanılır ve farklı protein hidrolizatları arasında karşılaştırma yapmak için en yaygın kullanılan göstergedir (Guérard vd., 2002). Protein hidrolizatlarının kullanımı, organoleptik ve teknofonksiyonel özellikleri ile sınırlıdır ve bu da büyük ölçüde hidroliz derecesi tarafından yönlendirilir. Bu tez çalışmasında *P. vulgata*'dan izole edilen protein konsantresinin hidroliz kapsamı Şekil 4.2.'de sunulmuştur.



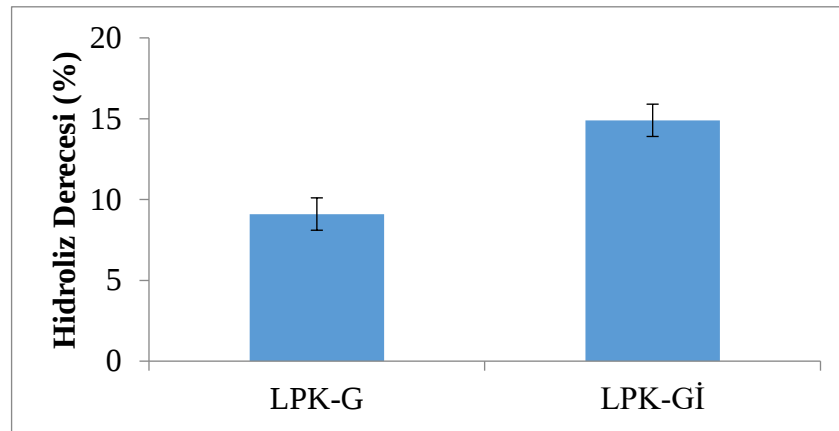
Şekil 4.2. Alkalaz ve Flavourzyme ile elde edilen limpet protein hidrolizatlarının hidrolizi

Limpet protein konsantresi biyofonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi Alkalaz ve Flavourzyme olmak üzere iki farklı proteaz tarafından 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika gibi farklı zaman aralıklarında hidrolize edilmiştir. Genel olarak, limpet protein konsantresi üzerinde iki farklı enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizinin, hidroliz süresindeki artışa bağlı olarak hidroliz derecesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Alkalaz ile üretilen limpet protein hidrolizatının bozulmamış limpet protein konsantresinden önemli ölçüde daha yüksek serbest amino grubu konsantrasyonu sergilediğini göstermiştir. İki hidrolizat arasında, Alkalaz tarafından üretilen hidrolizatlar 240 dakikalık hidrolizden sonra en yüksek hidroliz derecesini göstererek Flavourzyme ile karşılaştırıldığında limpet proteinlerini hidrolize etmede etkin rol oynadığını göstermiştir. Alkalaz, limpet protein konsantresi üzerinde Flavourzyme'den daha hızlı bir hidroliz oranı göstermiştir. Alkalaz, reaksiyonun ilk 60 dakikasında hidroliz derecesinde önemli bir artış sağlarken, Flavourzyme 240 dakikaya kadar hidrolizde önemli bir artışa ulaşmamıştır. 240 dakikalık hidroliz

sonunda, Alkalaz ile hidroliz derecesi 14.70 ± 1.02 mg N g⁻¹ protein iken, Flavourzyme ile 7.71 ± 0.32 mg N g⁻¹ protein olmuştur. Flavourzyme ile üretilen protein hidrolizatındaki 3.24 ± 0.12 mg amino grubu g⁻¹ protein ile karşılaştırıldığında, limpet protein izolatının Alkalaz ile hidrolizi sırasında 10.12 ± 0.88 mg amino grubu g⁻¹ protein artışı gözlenmiştir.

4.2.3.2. *In vitro* Gastrointestinal Sindirim Hidrolizatları

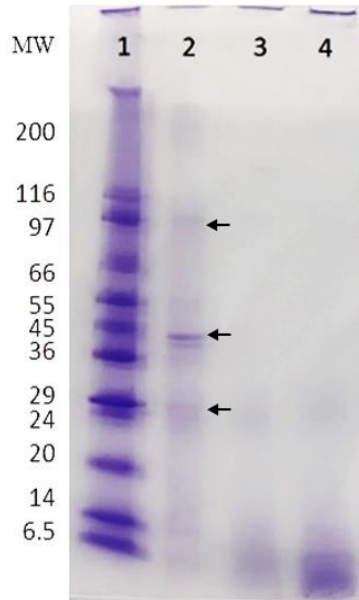
Gastrointestinal sindirim sırasında proteinler, gastrointestinal sistemde daha kolay emilen peptitlere (2-6 AA) ve serbest AA'lara ayrılmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Bu nedenle, insan gastrointestinal sistemindeki potansiyel kaderini aydınlatmak için limpet protein konsantresi üzerinde *in vitro* simüle edilmiş bir gastrointestinal sindirim gerçekleştirilmiştir. INFOGEST 2.0, insan gastrointestinal sisteminin fizyolojik yönlerini dikkate alarak *in vivo* gastrointestinal sindirimi taklit eden, yakın zamanda formüle edilmiş bir *in vitro* metodolojidir. Bu *in vitro* yöntem oral (bu çalışmaya dahil edilmemiş olsa da), gastrik ve gastrointestinal sindirimini simüle etmektedir. INFOGEST gastrik sindiriminin (LPK-G) ardından numunenin hidroliz derecesi değeri 9.1 ± 0.4 olmuştur (Şekil 4.3.). Bu değer gastrointestinal sindirimini (LPK-Gİ) takiben 14.9 ± 0.9 'a yükselmiştir. Aynı sindirim enzimi preparatları tarafından üretilen yeşil midye protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi ile karşılaştırıldığında, gastrik sindirimi takiben elde edilen hidrolizat, buradaki sonuçla neredeyse aynı hidroliz derecesine (%9) sahip olduğu belirlenmiştir (Vijaykrishnaraj vd., 2016). Ancak gastrointestinal sindirim sonucunda elde edilen hidroliz derecesinin pepsin sindirimine kıyasla azaldığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.3. *In vitro* gastrik ve gastrointestinal sindirimin ardından elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri

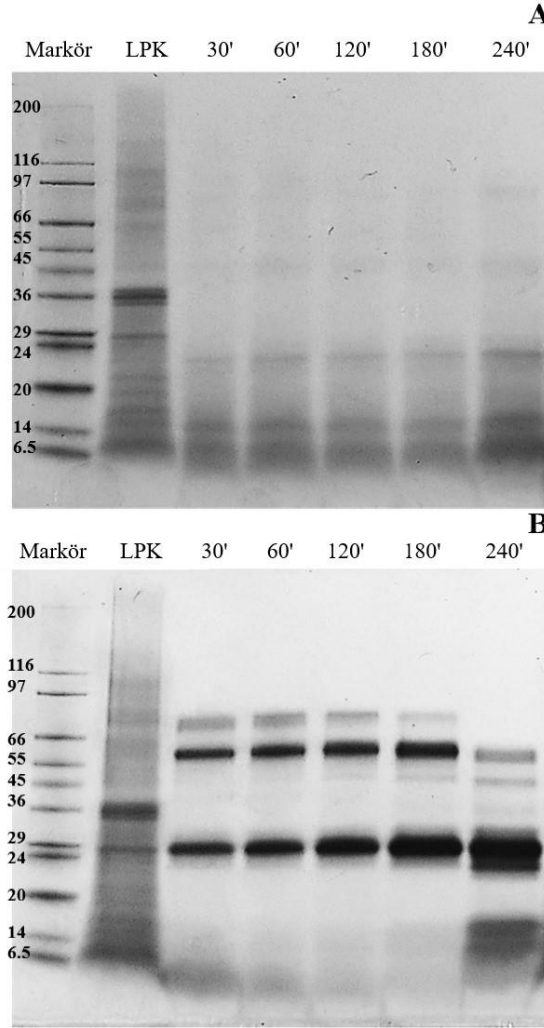
4.2.4. SDS-PAGE Profili

LPK'nın ve onun gastrik ve gastrointestinal sindirilmiş örneklerinin protein profilleri Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Sindirilmemiş limpet protein konsantresi, Porzio ve Pearson (1977) ile Margulis ve Pinaev (1976)'e göre miyozin hafif zincir-I veya troponin-I (24-25 kDa), troponin-T veya aktin (37-45 kDa) ve α -aktinin veya paramiyozin (102-105 kDa) gibi proteinlere karşılık gelebilecek yaklaşık 25, 37, 45 ve 105 kDa'lık bantlar oluşturmuştur. Benzer bantlar midye eti (*Perna perna*), istiridye protein izolatu (*Crassostrea gigas*) ve midye protein izolatında (*M. edulis*) da rapor edilmiştir (Jiang vd., 2019; Silva vd., 2010; C. Yu vd., 2018). Gastrik sindirimi takiben, bu bantlar (24-29 kDa bölgesindeki bantlar hariç) görülememiştir, bu da proteinin düşük molekül ağırlıklı peptitlere (<6.5 kDa) ve serbest AA'ya parçalandığını göstermektedir. Benzer sonuçlar Toomer vd. (2015) tarafından karides proteinleri için de elde edilmiş, *in vitro* gastrik sindirimin ardından protein bantları kaybolmuştur. Bununla birlikte, aynı çalışmada 25 kDa'da görüntülenen bir bant pepsin ve pankreatin sindiriminden sonra stabil kalmıştır. Xu vd. (2019), *M. edulis*'ten elde edilen suda çözünür proteinler ile *in vitro* simüle edilmiş sindirim hidrolizatları arasında bir fark olduğunu ve pepsin sindirimi öncesi ve sonrası arasındaki protein bantlarındaki farkın belirgin olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.4. Limpet protein konsantresinin ve INFOGEST sindirimini takiben karşılık gelen hidrolizatların SDS-PAGE profilleri 1: Moleküler ağırlık (MW) markörü (6.5-200 kDa), 2: LPK, 3: LPK-G, 4: LPK-GI, Yukarıdan aşağıya doğru oklar sırasıyla yaklaşık 105, 45 ve 25 kDa'lık bantları göstermektedir

Ayrıca, bizim tez çalışmamıza benzer şekilde, gastrik fazda molekül ağırlığı 10-37 kDa aralığındaki protein veya peptitlerin bağırsak sindirim fazında kaybolduğunu belirtmişlerdir. Sindirim enzimleri tarafından parçalanmaya karşı duyarlılığın yüksek oranda proteine bağlı olduğu daha önce bildirilmiştir. De Marchi vd. (2021) karides tozunun *in vitro* simüle edilmiş gastrointestinal sindirime duyarlılığını araştırmak için INFOGEST protokolünü kullanmıştır. Karides tropomiyozini gastrik sindirime karşı sınırlı stabilite gösterirken, sarkoplazmik kalsiyum bağlayıcı protein gastrointestinal sindirime karşı stabil kaldığı bildirilmiştir. Tez çalışmamızdaki SDS-PAGE profili, pepsin ve pankreatin sindiriminin ardından molekül ağırlığı 14 kDa'dan büyük olan bantların tespit edilmediğini göstermiştir; bununla birlikte, düşük molekül ağırlıklı peptitlerin üretildiğini gösteren molekül ağırlığı 14 kDa'dan küçük olan daha yüksek yoğunluklu bantlar gözlenmiştir.



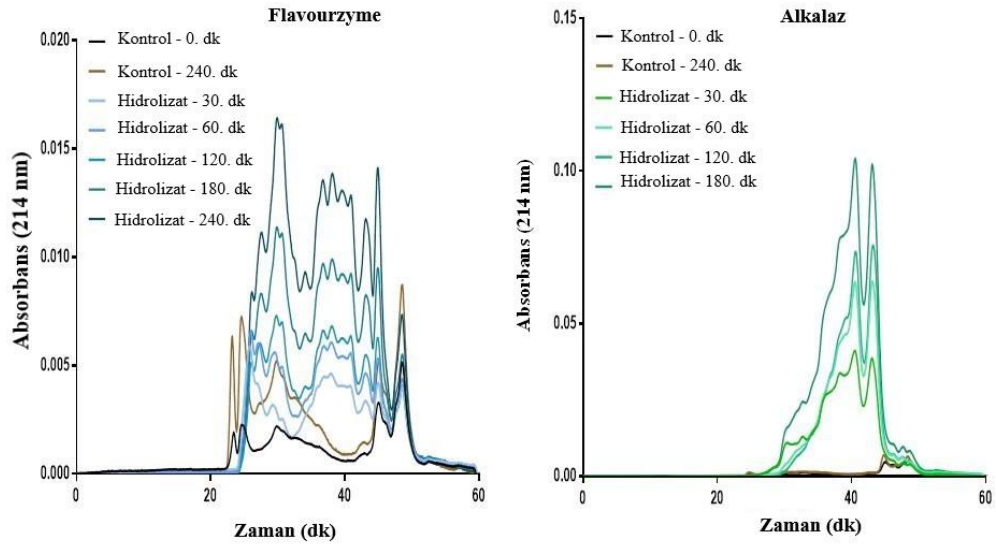
Şekil 4.5. Alkalaz (A) ve Flavourzyme (B) enzimleri ile elde edilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri

Hidrolize edilmemiş LPK ve LPK'dan Alkalaz ya da Flavourzyme enzimleri ile elde edilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Alkalaz enzimi kullanıldığında oluşan tüm peptitler 24 kDa'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Hidrolizin 30. dakikasından sonra görünür molekül ağırlığı yaklaşık 35-37 kDa olan proteinlerin (Tropomyosin ve Troponin-T) kaybolduğu gözlemlenmiştir. 240. dakikada oluşan peptitlerin yoğunluğu hidroliz derecesi sonuçlarına benzer şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.5. A ve Şekil 4.2.). Alkalaz enzim hidrolizinden daha yüksek hidroliz derecesi ve düşük moleküler ağırlığa sahip protein hidrolizatı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, Alkalaz'daki enzim kombinasyonunun ekzoproteaz ve endoproteazları içermesinden kaynaklanıyor olabilmektedir. Flavourzyme enzimi ile elde edilen protein hidrolizatlarına bakıldığında ise, yine hidroliz derecesi sonuçlarına benzer şekilde 240. dakikaya kadar etkin bir hidrolizin gerçekleşmediği ve protein bantlarının görünürlüğünde azalmanın meydana gelmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5. B ve Şekil 4.2.). 240. dakikadaki hidroliz numunesinde bazı bantların kaybolduğu ve 20 kDa'dan daha küçük peptitlerin yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, Flavourzyme'in proteinlerin sonundaki küçük peptitleri parçalayan ekzoproteazlar içermesine bağlanabilir.

4.2.5. Limpet Protein Hidrolizatlarının Moleküler Kütle Dağılımı

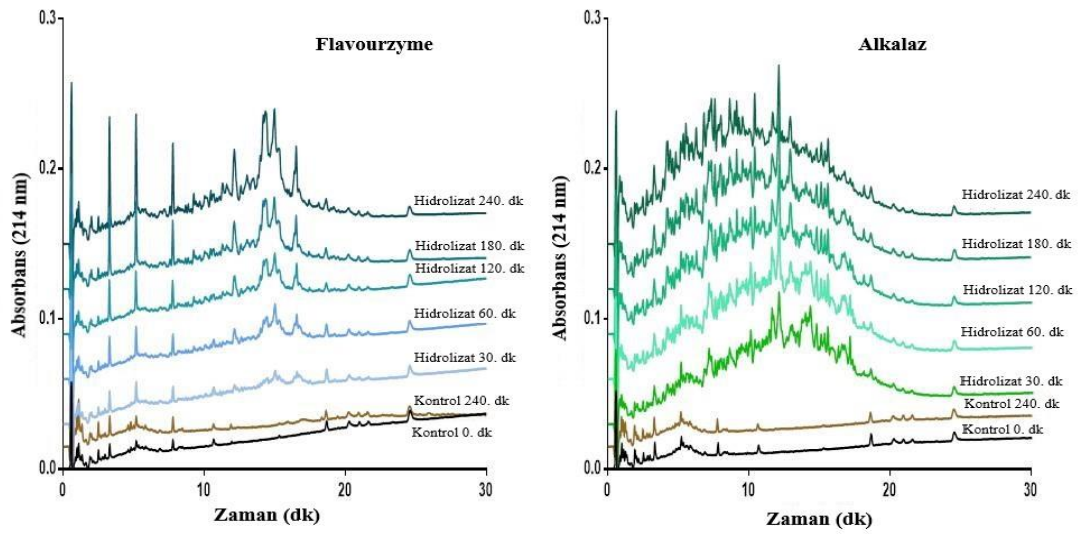
4.2.5.1. Enzimatik Protein Hidrolizatları

Alkalaz veya Flavourzyme enzimleri ile oluşturulan limpet protein hidrolizatlarının moleküler kütle dağılımı Şekil 4.6.'de gösterilmektedir. İki örneğin GP-HPLC profilleri hidroliz edilmemiş limpet protein konsantreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında büyük farklılıklar göstermektedir. Her iki enzimle hidroliz sırasında, kontrol numunelerine kıyasla hidrolizatlarda daha yüksek oranda düşük moleküler kütleli bileşenler bulunmuştur. Bu durum, moleküler kütle dağılım profillerinin hidroliz koşullarından enzime bağlı bir şekilde etkilendiği anlamına gelmektedir.



Şekil 4.6. Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri elde edilen limpet protein hidrolizatlarının moleküler kütle dağılım profilleri

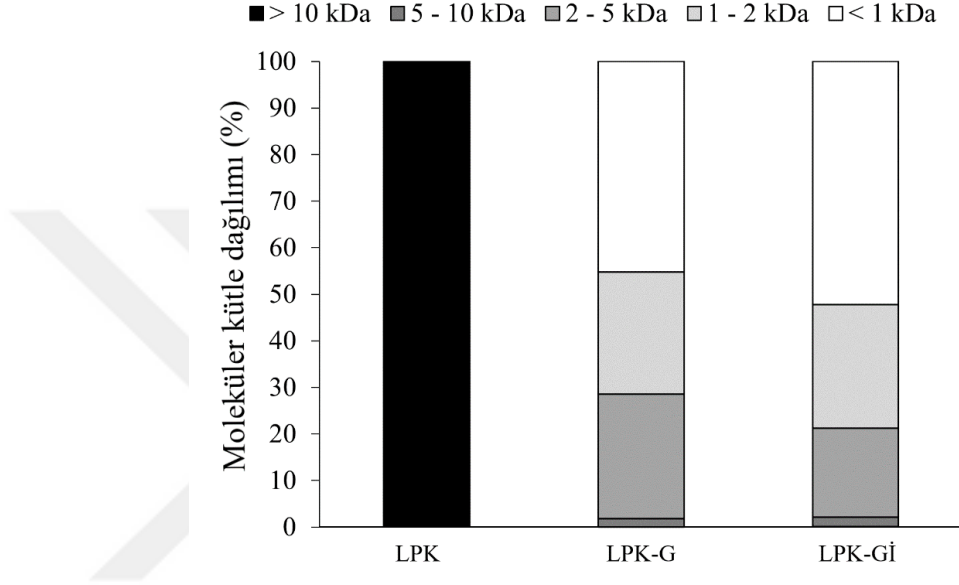
Limpet protein konsantresi farklı enzim preparatları ile 240 dakika boyunca hidrolize edildiğinde, Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi farklı RP-UPLC profilleri elde edilmiştir. Kromatogramlar boyunca, hidrolizatların çok çeşitli hidrofobikliklere sahip peptitler içerdiğini gösteren farklı peptit pikleri gözlenmiştir. Çeşitli enzim preparatları tarafından üretilen hidrolizat profillerindeki farklılıklar, kullanılan her bir enzim preparatı arasındaki hidrolitik özgüllük farklılıklarını göstermektedir.



Şekil 4.7. Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri ile elde edilen limpet proteinlerinin hidrolizatlarının RP-HLPC profilleri

4.2.5.2. *In vitro* Gastrointestinal Sindirim Hidrolizatları

In vitro sindirilmiş çözünür protein hidrolizatlarının ve sindirilmemiş protein konsantrisinin moleküler kütle dağılımını değerlendirmek için numuneler GP-HPLC ile analiz edilmiştir. GP-HPLC sonuçları, en yüksek hidroliz derecesine karşılık gelen gastrointestinal sindirimden sonra en yüksek miktarda düşük moleküler kütleli proteinli bileşenlerin elde edildiğini göstermiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Limpet protein konsantrisi, gastrik ve gastrointestinal sindirim hidrolizatlarının moleküler kütle dağılımları

Düşük molekül kütleli proteinli bileşenler genellikle gastrointestinal sistemden daha iyi absorbe edilmektedir (Wang ve Li, 2017). Buradaki GP-HPLC sonuçları SDS-PAGE sonuçları ile uyumludur. 2 saatlik gastrik sindirimin ardından, proteinli bileşenlerin %45.24'ü molekül ağırlığı 1 kDa'dan daha düşük molekül ağırlığına ve proteinli bileşenlerin %1.79'u 5 - 10 kDa arasında molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. 2 saatlik gastrointestinal sindirimin ardından, proteinli bileşenlerin %52.23'ünün moleküler kütlesi 1 kDa'dan daha düşük olduğu, %26.53'ünün moleküler kütlesi 1 - 2 kDa arasında olduğu, %19.08'inin moleküler kütlesi 2 - 5 kDa arasında olduğu ve yalnızca %2.01'inin moleküler kütlesi 5 - 10 kDa arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8.). Gastrik ve gastrointestinal sindirimin ardından, 1 kDa'dan daha düşük proteinli bileşenlerin oranı %45.24'ten %52.23'e yükselmiştir. Bu, gastrik ve gastrointestinal sindirimden sonra LPK'daki proteinli bileşenlerin parçalandığını ve daha düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin üretildiğini göstermiştir. Zhang vd. (2019),

istiridye etinde molekül ağırlığı 1 kDa'dan düşük olan proteinli bileşenlerin oranının gastrik sindirimden sonra %27.6 ve gastrointestinal sindirimden sonra %49.7 olduğunu bildirmiştir.

4.3. Limpet Protein Hidrolizatlarının *in vitro* Biyolojik Aktiviteleri

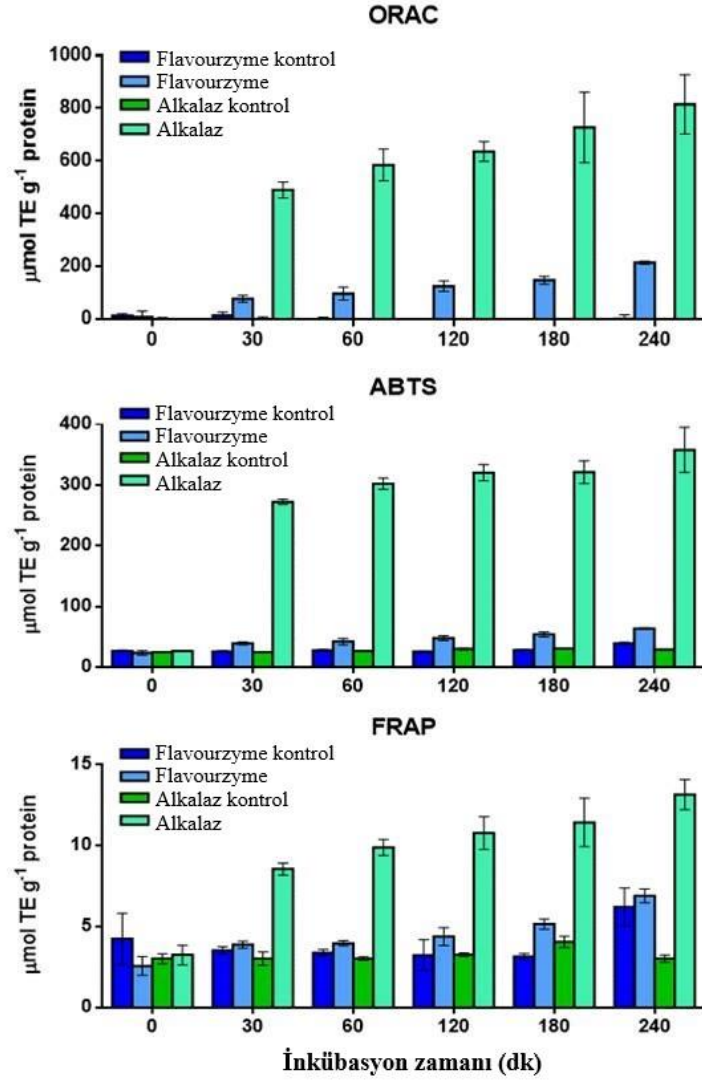
4.3.1. Enzimatik Protein Hidrolizatları

Antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların ilerlemesine yol açabilecek zararlı oksidasyon mekanizmalarını önlemek için kullanılmaktadır. Antioksidan hidrolizatlar serbest radikallerle etkileşime girebilir, radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırabilir veya hidrojen-elektron bağışı yaparak oluşumlarını önleyebilmektedir. Bu nedenle, limpet protein hidrolizatları antioksidan aktivitenin analizi için üç farklı mekanizmaya sahip farklı *in vitro* antioksidan deneyler (FRAP, ABTS ve ORAC) kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar, Troloks çözeltisinin (mM) konsantrasyonunu, incelenen maddenin 1 mM'ı için bulunan eşdeğer bir antioksidan kapasite ile karşılaştıran Troloks eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmiştir. Troloks, E vitamininin suda çözünen bir türevidir ve potansiyel biyoaktif olabilecek bileşiklerinin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılan bir bileşiğin TE değeri, her ikisi de aynı antioksidan aktiviteye sahip olduğunda Troloks konsantrasyonu ile bileşiğin konsantrasyonu arasındaki orandır (Apak vd., 2004; Huang vd., 2002). Böylece, sonuçlar ne kadar yüksekse antioksidan kapasitenin o kadar güçlü olduğu anlamına gelmektedir. Alkalaz ile hidrolize edilen tüm protein hidrolizatları, Flavourzyme ile üretilen hidrolizatlara ve hidroliz edilmemiş limpet protein konsantrelerine (kontroller) kıyasla önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktivite (FRAP, ABTS ve ORAC) göstermiştir (Şekil 4.9.).

Alkalaz enzimi ile üretilen tüm hidrolizatlar, FRAP analizinde Flavourzyme ile üretilen eşdeğer protein hidrolizatlarından daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Alkalaz enzimi ile farklı sürelerde (30, 60, 120, 180 ve 240. dakika) elde edilen hidrolizatlar için sırasıyla 8.55 ± 0.37 , 9.88 ± 0.49 , 10.77 ± 1.00 , 11.42 ± 1.49 ve 13.14 ± 0.93 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein FRAP değerleri kaydedilmiştir. Bu değerler, Flavourzyme ile üretilen eşdeğer protein hidrolizatları için sırasıyla 3.88 ± 0.22 , 3.97 ± 0.17 , 4.38 ± 0.55 , 5.15 ± 0.31 ve 6.89 ± 0.43 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein ile karşılaştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, yumuşakçalardan Alkalaz veya Flavourzyme kullanılarak elde edilen hidrolizatların sonuçları TE ile ifade edilmiş FRAP aktiviteleri hakkında literatürde karşılaştırma yapabileceğimiz herhangi bir çalışma rapor

edilmemiş görünmektedir.

Kullanılan enzime ve hidroliz sürelerine bağlı olarak, limpet protein hidrolizatlarının ORAC değerleri $77.41 \pm 12.62 - 815.26 \pm 112.56 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein aralığında olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmamızda Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri ile elde edilen hidrolizatlar, hidrolize edilmemiş limpet protein konsantrelerinden (kontroller) daha güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. ORAC analizinin bulgularına göre, limpet protein hidrolizatlarının antioksidan değerleri, Flavourzyme ile 240 dakika inkübe edildiğinde 77.41 ± 12.62 ila $214.65 \pm 5.23 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein arasında, Alkalaz ile 240 dakika inkübe edildiğinde ise 490.73 ± 30.50 ila $815.26 \pm 112.56 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein arasında değişmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, ORAC analizi kullanılarak limpet protein hidrolizatlarının antioksidan yeteneği daha önce hiçbir çalışmada bildirilmemiştir. Ancak, Neves vd. (2016a)'ın farklı bir yumuşakça türü ile yaptıkları çalışmaya bakıldığında ORAC değerleri 66.26 ila $121.56 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ arasında değişen midye eti hidrolizatları ile karşılaştırıldığında, limpet protein konsantresinden elde edilen hidrolizatlar önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Ayrıca protein kaynağı olarak yine farklı bir yumuşakça türü olan mavi midye (*M. edulis*)'nin kullanıldığı bir çalışmada, farklı tipte peptitler üretmek için Alkalaz, α -chymotrypsin, Flavourzyme, Neutrase, papain, pepsin, Protameks ve tripsin dahil olmak üzere sekiz farklı proteaz formu ile hidrolize edilmiştir ve ORAC değerinin ($199.62 \mu\text{mol TE mg}^{-1}$ örnek) α -kimotripsin ile üretilen hidrolizatta en güçlü antioksidan kapasitesiye sahip olduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2019). Je vd. (2015)'nın bildirdikleri bir çalışmada ise dört farklı proteaz (Alkalaz, Flavourzyme, Neutrase ve Protameks) kullanılarak deniz yumuşakçası olan deniz kulağı iç organlarından elde edilen biyoaktif protein hidrolizatları arasında en yüksek ORAC değeri ($415 \mu\text{mol TE mg}^{-1}$ numune) Alkalaz ile üretilen hidrolizatta bulunmuştur. Bu sonuçların tümü, bu tez çalışmasında Alkalaz ile üretilen limpet protein hidrolizatları için elde edilen $815.26 \pm 112.56 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ protein olan ORAC değerinden daha düşüktür.



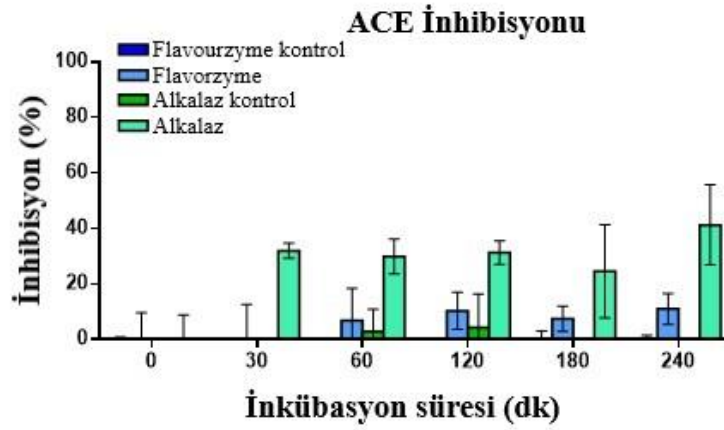
Şekil 4.9. Alkalaz ve Flavourzyme ile elde edilen limpet protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri

ABTS deneyi, hidrojen bağlayıcı ve zincir kırıcı antioksidan bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yararlı bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri ile oluşturulan limpet protein hidrolizatları için sırasıyla 358.11 ± 37.09 ve 63.94 ± 1.08 $\mu\text{M TE g}^{-1}$ protein ABTS⁺ radikalini indirgeme değerleri elde edilmiştir. Diğer antioksidan aktivite deneylerine benzer şekilde, Alkalaz ile 240 dakika inkübe edilen hidrolizatlar en yüksek ABTS⁺ indirgeme aktivitesini gösterirken, Flavourzyme ile 30 dakika inkübe edilen hidrolizatlar en düşük aktiviteyi göstermiştir. Flavourzyme ile üretilen hidrolizatlardaki daha düşük antioksidan aktiviteler, bu hidrolizatlardaki daha düşük hidroliz derecesi ile ilişkili olabilmektedir. Protein kaynağı olarak farklı bir yumuşakça türü olan mavi midye (*M. edulis*)'nin kullanıldığı ve Alkalaz, Flavourzyme ve α -chymotrypsin enzimlerinin de

olduğu sekiz farklı proteazın kullanıldığı bir çalışmada, ABTS^{•+} radikal indirgeme değerinin (117 µmol TE mg⁻¹ örnek) α-kimotripsin ile üretilen hidrolizatta en güçlü antioksidan kapasitesiye sahip olduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2019). Bir başka yumuşakça organizması olan kalamar (*Uroteuthis (Photololigo) duvaucelii*)'ın protein kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada, Alkalaz kullanılarak %13.7 hidroliz derecesine sahip kalamar proteini hidrolizatları hazırlanmış ve hidrolizatların %94 ABTS^{•+} inhibisyonuna sahip olduğu bildirilmiştir (Parthiban vd., 2017). Dhanabalan vd. (2017)'nin bildirdikleri çalışma da ise karideslerden (*Acetes indicus*) Alkalaz ile hazırlanan protein hidrolizatı ABTS^{•+} radikal indirgeme aktivitesi göstermiş ve protein hidrolizatının %5 konsantrasyonunda en yüksek 118.25 µmol TE değerine ulaşmıştır.

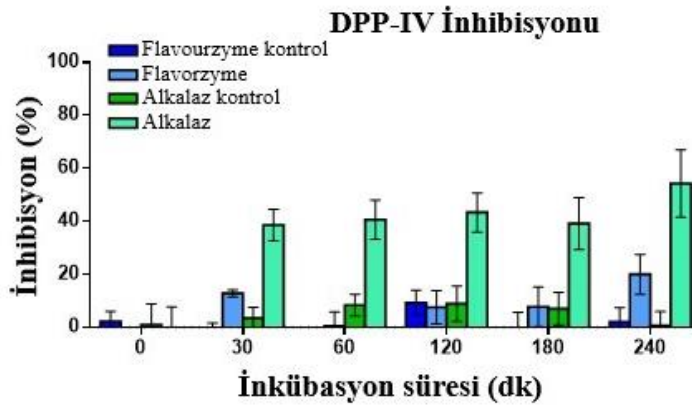
Bu sonuçlar, Alkalaz ile üretilen limpet protein hidrolizatlarının, Flavourzyme ile elde edilen hidrolizatlardan daha güçlü hidrojen atomu ve elektron transfer yeteneklerine (ABTS analizi) ve demir iyonu indirgeme gücüne (FRAP analizi) ve ayrıca peroksil radikallerine karşı indirgeme aktivitesine (ORAC analizi) sahip olduğunu göstermektedir.

Limpet protein hidrolizatlarının ACE (%) inhibitör aktivitesi Şekil 4.10.'de gösterilmiştir. Hidrolizatların ACE yüzde inhibisyon değerleri, 240 dakika boyunca Flavourzyme ile hidrolize edildiğinde 11.03 ± 5.62 'ye, 240 dakika boyunca Alkalaz ile hidrolize edildiğinde 41.24 ± 14.40 'a ulaşmıştır. Tüm limpet protein hidrolizatlarının inhibisyon yüzdesi 0.39 ± 8.54 ile 41.24 ± 14.40 arasında değişirken, Alkalaz enzimi ile üretilen 240. dakikadaki hidrolizat en yüksek ACE inhibitör potansiyelini göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Kaptopril için % inhibisyon değeri 94.85 ± 14.35 olduğu belirlenmiştir. Sunulan sonuçlar, limpet protein hidrolizatından üretilen Alkalaz (240 dakika) hidrolizatlarının ACE inhibitör özelliklere sahip ortalama bir hidrolizat kaynağı olduğunu göstermektedir. Ayrıca sonuçlar, hidroliz derecesinin ve enzim seçiminin ACE inhibitör aktivitesi üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Alkalaz ve Flavourzyme ile oluşturulan limpet protein hidrolizatlarının *in vitro* anjiyotensin-I-dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu

Dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV), tip 2 diyabetin önlenmesi ve tedavisi için önemli bir enzimdir. İncretin hormonları glukoza bağlı insülinotropik polipeptit (GIP) ve glukagon benzeri polipeptit-1 (GLP-1) bu enzim tarafından inaktive edilir ve bu da kan glukoz seviyelerinin yükselmesine neden olabilmektedir. DPP-IV inhibitör deneyi, limpet protein hidrolizatlarının antidiyabetik bileşenler olarak yeteneklerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Tüm limpet protein hidrolizatları arasında, Alkalaz enzimi ile elde edilen limpet protein hidrolizatları daha yüksek oranda DPP-IV inhibisyonu sergilemiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Alkalaz ve Flavourzyme ile oluşturulan limpet protein hidrolizatlarının *in vitro* dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) inhibisyonu

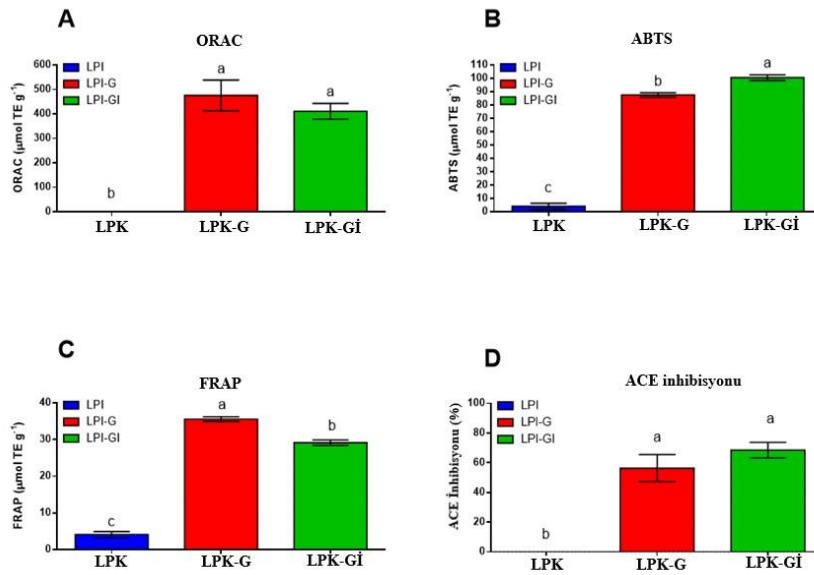
Hidrolizatların DPP-IV inhibisyonu (%) değerleri, 240 dakika boyunca Alkalaz ile hidrolize edildiğinde 38.52 ± 5.83 – 54.19 ± 12.74 ve 240 dakika boyunca

Flavourzyme ile hidrolize edildiğinde $0.44 \pm 5.30 - 19.95 \pm 7.55$ arasında değişmektedir (Şekil 4.11.). Alkalaz enzimi ile elde edilen limpet protein hidrolizatları (240. dakika) 54.19 ± 12.74 inhibisyon değeriyle en yüksek ortalama DPP-IV inhibitör aktivitesine sahiptir. Ancak bu aktivite Diprotin A için elde edilenden (64.38 ± 9.28) daha düşüktür. Ayrıca, Flavourzyme ile oluşturulan tüm hidrolizatlar 60, 120 ve 180. dakikalarda sırasıyla 0.44 ± 5.30 , 7.58 ± 6.23 ve 7.72 ± 7.52 ile en düşük inhibisyon (%) değerlerine sahiptir. Alkalaz ile 30, 60, 120 veya 180 dakika hidrolizden sonra oluşan hidrolizatlar arasında DPP-IV inhibitör aktivitesi açısından önemli bir fark bulunmamıştır. DPP-IV inhibitör aktivitesinin büyük ölçüde hidrofobik peptitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Nongonierma ve FitzGerald, 2017a). Doğrudan enzimatik hidroliz ile elde edilen limpet protein hidrolizatlarının biyoaktif özellikleri bugüne kadar literatürde rapor edilmemiş görünmektedir.

4.3.2. *In vitro* Gastrointestinal Sindirim Hidrolizatları

Antioksidanlar hem sağlığın korunması hem de gıdaların muhafazası için gereklidir. Sentetik antioksidanlar gıda ve ilaç sektörlerinde sıklıkla kullanılmaktadır, ancak güvenli ve etkili doğal antioksidanların belirlenmesine yönelik artan bir ilgi vardır. Bu nedenle tez çalışmamızda, LPK ve ilgili sindirimlerinin *in vitro* antioksidan özellikleri ORAC, ABTS ve FRAP analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, Troloks çözeltisinin (mM) konsantrasyonunu, incelenen maddenin 1 mM'ı için bulunan eşdeğer bir antioksidan kapasite ile karşılaştıran Troloks eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmiştir. Şekil 4.12.'da gösterildiği gibi, analiz edilen tüm *in vitro* LPK sindirimleri sindirilmemiş LPK'dan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. LPK-G örneklerinin ORAC, ABTS ve FRAP antioksidan aktivitesi sırasıyla 475.70 ± 62.75 , 87.55 ± 1.64 ve 35.54 ± 0.66 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. ORAC ve FRAP aktiviteleri (410.57 ± 32.19 ve 29.14 ± 0.74 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) için, pankreatin ile sindirimden sonra antioksidan aktivitede bir azalma olmuştur, bu da moleküler kütle dağılımı ve hidroliz derecesindeki değişime bağlanabilir. Bununla birlikte, ABTS (100.49 ± 2.10 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) aktivitesi gastrointestinal aşamasından sonra hafifçe artmıştır. Üç test farklı oksidasyon mekanizmalarına sahip olduğundan, LPK sindirimlerindeki antioksidan yeteneğin testler arasında farklılık göstermesi anlaşılabilir bir durumdur. Ayrıca, peptitlerin AA bileşimi, moleküler kütlesi, yapısı ve hidrofobikliğinin antioksidatif etkileriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bildiğimiz kadarıyla, limpet protein konsantresi ve onun *in vitro*

sindirimlerinin antioksidan kapasitesi hakkında daha önce hiçbir çalışma rapor edilmemiştir. Ancak, Zhang vd. (2019) benzer şekilde istiridye etinin ORAC değerinin gastrik sindirimden sonra önemli ölçüde arttığını ve gastrointestinal sindiriminden sonra azaldığını ve gastrointestinal basamağın genel olarak istiridye etinin ORAC değerini %10.5 oranında artırdığını bildirmiştir. Corolase PP (domuz pankreatik enzim preparatı) enzimi kullanılarak elde edilen midye eti hidrolizatları ile karşılaştırıldığında, ORAC değerleri 79.96 ila 91.71 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ arasında değiştiği bildirilmiştir (Neves vd., 2016a). Bir başka çalışmada ise, sekiz farklı proteaz ile enzimatik hidroliz yoluyla hazırlanan hidrolizatlar arasında, mavi midye-kimotripsin hidrolizatının diğer hidrolizatlara kıyasla ABTS^{•+} radikal giderme ($117 \pm 3.5 \mu\text{M TE mg}^{-1}$ numune) ve ORAC testinde ($199.62 \pm 1.42 \mu\text{M TE mg}^{-1}$ numune) en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği bildirilmiştir (Oh vd., 2019).



Şekil 4.12. *In vitro* gastrointestinal sindirim hidrolizatlarının (A) ORAC deneyi, (B) ABTS radikal indirgeme deneyi, (C) FRAP ve (D) ACE inhibisyonu kullanılarak biyolojik aktiviteleri

ACE, damar daraltan (vazokonstriktör) anjiyotensin II üreterek ve bradikinin'i (vazodilatör – damar genişletici) inaktive ederek kan basıncını yükseltebilen çok işlevli bir metalloenzimdir. Bu nedenle, ACE inhibisyonu hipertansiyon tedavisi için kritik bir hedef olarak tanımlanmıştır (Norris vd., 2012). Gastrik aşamada pepsin kullanılarak oluşturulan LPK-G örnekleri, 56.36 ± 9.13 ACE inhibisyon değeri ile (0.2 mg ml^{-1} son konsantrasyonunda) orta düzeyde aktivite sergilemiştir (Şekil 4.12.). Bu aktivite, pankreatin ile hidrolizi takiben 68.50 ± 5.20 'ye önemli ölçüde artmıştır. LPK ve sindirimlerinin ACE inhibitör özelliklerini belirleyen daha önce hiçbir çalışma

yapılmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik ACE inhibitörü ilaç kaptopril (30 nM) için %94.85'lik bir inhibisyon değeri elde edilmiştir. Naik vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, 12 aylık bir süre boyunca İrlanda'nın farklı yerlerinden toplanan midyelerden elde edilen midye yan ürünü hidrolizatlarının biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Örnekler 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda test edildiğinde, ACE inhibitör aktivitesinin %22 - 86 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Literatürdeki önceki araştırmalar düşük molekül ağırlıklı peptitlerin yüksek molekül ağırlıklı peptitlerden daha aktif olduğunu, çünkü ACE aktif bölgesine daha kolay erişebildiklerini ve katalitik aktivitesini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir (Iwaniak vd., 2014). Tez çalışmamızda, ACE inhibisyonuna katkıda bulunmuş olabilecek 2 kDa'dan daha küçük peptitler, LPK-G ve LPK-Gİ'den sonra sırasıyla %71.47 ve %78.74 olarak bulunmuştur. F. Yu vd. (2018), istiridyenin (*Cyclina sinensis*) tripsin hidrolizatlarından elde edilen ve ultrafiltrasyon ile ayrılan 3 kDa'dan küçük molekül ağırlıklı fraksiyonunun %54.55'lik inhibitör aktivite ile en güçlü ACE inhibisyon aktivitesini gösterdiğini bildirmiştir.

4.4. LC-MS/MS ile Peptit Dizilimlerinin Belirlenmesi

INFOGEST yöntemi kullanılarak *in vitro* gastrointestinal sindiriminin ardından elde edilen hidrolizatlardan tanımlanan peptitler Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Uniprot veri tabanı arama yaklaşımı kullanılarak her iki hidrolizatta toplam 51 peptit tanımlanmıştır; bunlardan sırasıyla 31 ve 13 peptit LPK-G ve LPK-Gİ'de benzersizken, 7 peptit her iki hidrolizatta bulunmuştur (Şekil 4.13. ve Tablo 4.4.).

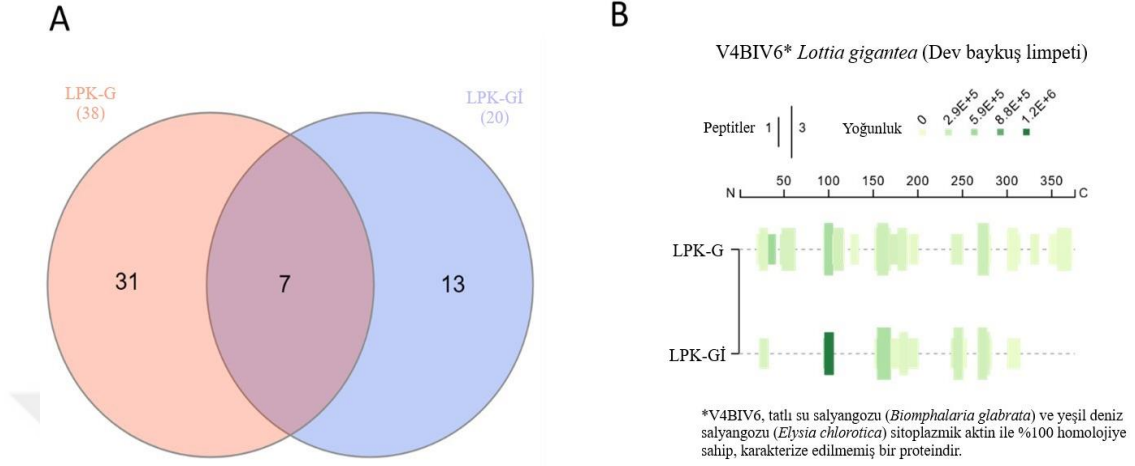
LPK-G'de tanımlanan peptit sayısı LPK-Gİ'dekinden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bunun nedeni, peptitlerin tekli AA'ya daha fazla bozunması veya veritabanı aramasının 5 AA'dan daha büyük peptitlerle sınırlandırılması olabilir. Şekil 4.13., *in vitro*-simüle gastrik (LPK-G) ve gastrointestinal (LPK-Gİ) sindirime maruz bırakılan bir LPK'den elde edilen peptitlerin yanı sıra *in siliko* analizle ilişkili kütle spektrometresi sonuçlarının görselleştirilmesi ve karşılaştırılması gibi çeşitli yorumları göstermektedir. Her bir dikey çubuğun yüksekliği bu pozisyonadaki örtüşen peptitlerin sayısı ile orantılıdır, yeşil rengin koyuluğu ise örtüşen peptitlerin yoğunluklarının toplamıyla orantılıdır. Kesikli çizgiler o pozisyonda hiçbir peptitin tespit edilemediğini göstermektedir.

Tablo 4.4. *In vitro* gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatların sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile Uniprot veri tabanı kullanılarak peptitlerin tanımlanması

Peptit	Protein Erişim Numarası	Başlama	Son	LPK-G	LPK-Gİ
AEKNLTTV	V4AF36	84	91	X	0
AGDDAPRAV	V4BIV6	23	31	X	0
AGDDAPRAVF	V4BIV6	23	32	0	X
AGFAGDDAPRAV	V4BIV6	20	31	X	0
AGPRGLTGNVGER	J7QJU2	621	633	X	0
AQLQASNDLKL	V4BXE5	255	265	X	0
ASLSTFQQM	V4BIV6	348	356	X	0
CMIVDEST	V3ZT45	13	20	0	X
DLAGRDLTDYL	V4BIV6	180	190	0	X
DSGDGVTHTVPIYE	V4BIV6	155	168	0	X
DSGDGVTHTVPIYEG	V4BIV6	155	169	X	X
EKSYELPDGQVIT	V4BIV6	238	250	X	X
FETFNAPAM	V4BIV6	125	133	X	0
FQLTHSLGGGTGSGMGT	V4BIV6	133	149	X	0
FQLTHSLGGGTGSGMGTL	V3ZEI5	133	150	0	X
GIIPGIKVDKGVVPL	V4A4F2	102	116	X	0
GYALPHAIL	V4BIV6	169	177	0	X
IVLDSGDGVTHTVPI	V4BIV6	152	166	X	0
IVLDSGDGVTHTVPIYEG	V4BIV6	152	169	X	X
IVNIAHEGAEQ	V4BXE5	129	139	X	0
IVNIAHEGAEQS	V4BXE5	129	140	X	0
KIKIAPPE	V4BIV6	327	335	X	0
LGMESAGIHE	V4BIV6	268	277	0	X
LGMESAGIHET	V4BIV6	268	279	X	0
LGMESAGIHETTY	V4BIV6	268	280	0	X
LGMESAGIHETTYN	V4BIV6	268	281	X	0
LGMESAGIHETTYNS	V4BIV6	268	282	0	X
LRVAPEEHPV	V4BIV6	95	104	X	0
LRVAPEEHPVL	V4BIV6	95	105	X	X
LTEAPLNPKAN	V4BIV6	106	116	X	0
LTEAPLNPKANR	V4BIV6	106	117	X	0
MGQKDSYVGDEAQS	V4BIV6	48	62	X	0
MKİLTERJİLER	V4BIV6	191	200	X	X
PSIVGRPR	V4BIV6	33	40	X	0
RLDLAGRDLT	V4BIV6	178	187	X	0
RLDLAGRDLTD	V4BIV6	178	188	X	X
RLEEQGGATSAQ	V4BXE5	98	109	X	0
RVAPPEHPV	V4BIV6	96	104	X	0
RVAPPEHPVL	V4BIV6	96	105	0	X
SGGTTMFPGIA	V4BIV6	301	311	X	0
SGGTTMFPGIADRM	V4BIV6	301	314	X	X
SSINDTLANKV	V4AF36	36	46	X	0
SSINDTLANKVRQ	V4AF36	36	48	X	0
VGMGQKDSYVGDEAQS	V4BIV6	46	62	X	0
VGPAGARGPAGDDGSNGPMMGPR	J7QJU2	1044	1065	X	0
WISKQEYDESGPSIV	V4BIV6	357	371	X	0
WISKQEYDESGPSIVH	V4BIV6	357	372	X	0
YALFAIL	V4BIV6	170	177	X	0
YELPDGQVIT	V4BIV6	241	250	0	X
YELPDGQVITIGNE	V4BIV6	241	254	0	X
YYNEATGGKYPRAVL	V3ZEI5	50	65	0	X

* Protein erişim numarası, Uniprot veri tabanındaki proteini ifade etmektedir. X ve 0, sırasıyla test örneğindeki varlığı ve yokluğu ifade etmektedir

Analiz sonucu, dev baykuş limpet türü olan *L. gigantea*'dan alınan karakterize edilmemiş bir proteinin (V4BIV6) LPK-G ve LPK-Gİ hidrolizatlarında sırasıyla %51 ve %32 ile en yüksek protein kapsamına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. *In vitro* gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatlarda tanımlanan peptitlerin Uniprot veri tabanı yaklaşımı kullanılarak Venn diyagramı (A) ve dev baykuş limpetinden elde edilen aktinin peptit kapsamını temsil eden peptigram (B)

Bu karakterize edilmemiş protein, tatlı su salyangozu (*Biomphalaria glabrata*) ve deniz salyangozu (*Elysia chlorotica*) gibi diğer organizmalardan elde edilen aktin ile %100 homolojiye sahiptir. Bulunan diğer proteinler (karakterize edilmemiş ancak benzer türlerle %100 homolojiye sahip) *L. gigantea*'dan paramyosin (V4AF36) ve myosin (V4BXE5) ve LPK-G durumunda *P. vulgata*'dan nacrein benzeri 2 proteindir (%3 kapsama alanı).

Tablo 4.5., *de novo* yaklaşımı kullanılarak seçilen proteinler içinde tanımlanan peptitleri listelemektedir. Her iki örnekte de LPK-G için 7 ve LPK-Gİ için 6 olmak üzere toplam 13 peptit tanımlanmış ve ortak peptit gözlenmemiştir. Genel olarak, sonuçlar gastrik sindirimin daha fazla sayıda peptit ürettiğini, gastrointestinal sindirimin ise muhtemelen 5'den düşük AA'lı dizilere peptit bozunması nedeniyle daha düşük peptit tanımlamasıyla sonuçlandığını göstermektedir. Daha önce gözlemlendiği gibi, LPK-Gİ'nin hidroliz derecesi LPK-G'den önemli ölçüde daha yüksekti, bu da daha fazla peptit bozunmasına işaret etmektedir.

Tablo 4.5. *In vitro* gastrik ve gastrointestinal sindirimden elde edilen hidrolizatların sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile *de novo* yaklaşım kullanılarak peptitlerin tanımlanması

Peptit	ALC* (%)	Uzunluk	m/z	z	Yerel güven (%)	Protein erişim numarası	Hidrolizat
AILR	90	4	236.6784	2	93 92 92 84	V4BIV6	LPK-Gİ
ALGGF	94	5	464.2506	1	96 96 94 92 95	V3ZT45	LPK-Gİ
AVATQ	97	5	489.2695	1	95 95 98 99 99	V4AF36	LPK-G
AVLSL	94	5	502.3222	1	89 88 98 98 98	V4BIV6	LPK-Gİ
IANL	90	4	430.2714	1	99 96 88 78	V4AF36	LPK-G
IGAP	91	4	357.217	1	98 83 94 91	J7QJU2	LPK-G
IIIEI	98	4	487.3203	1	98 97 98 99	V4BXE5	LPK-G
IQEL/LKEL	92	4	502.2908	1	93 88 93 94	V3ZEI5/ V3ZT45	LPK-Gİ
LVII	97	4	457.3428	1	98 94 98 98	V3ZT45	LPK-Gİ
VILF	96	4	491.3318	1	96 97 98 95	V4AF4F2	LPK-G
YALPH	96	5	300.6656	2	98 98 99 96 91	V4BIV6	LPK-G
YALFHAIL	91	8	449.2695	2	68 80 99 96 95 97 99 99	V4BIV6	LPK-Gİ
YANT	92	4	468.2139	1	92 90 89 96	V4BIV6	LPK-G

*ALC: peptit dizisinde tahmin edilen amino asitleri için sonucun ne kadar güvenilir olduğunu gösteren ortalama yerel güven puanlarını temsil etmektedir

Midye, istiridye ve deniz tarağı gibi benzer deniz yumuşakçalarından elde edilen protein hidrolizatlarından yeni antioksidan ve ACE inhibitör peptitler tanımlanmıştır (K. Asha vd., 2016; Jung vd., 2007; Qian vd., 2008; Sasaki vd., 2019; Umayaparvathi vd., 2014; Wang vd., 2008; Wu vd., 2016; Yang vd., 2019). Tez çalışmamızda *de novo* analiz yoluyla tanımlanan peptitlerin çoğunluğu, dizilerinin farklı pozisyonlarında hidrofobik AA rezidüleri tespit edilmiştir. Bu tür AA'ların varlığı, peptitlerin antioksidan aktivitesi ve ACE inhibitör potansiyeli ile ilişkilendirilmektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Burada tanımlanan peptitlerde, YANT hariç, antioksidan potansiyele katkıda bulunduğu yaygın olarak kabul edilen Leu, Val ve Ile gibi en az bir hidrofobik ve dallı zincirli AA'nın varlığı, antioksidan aktivitelerine katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca, biyoaktif peptitlerin C-terminalinde Pro, Phe, Trp veya Tyr ve N-terminal pozisyonunda Val, Leu veya Ile gibi aromatik ve hidrofobik AA'ların varlığı ACE inhibitör aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Harnedy ve FitzGerald, 2013a). Genel olarak, tanımlanan peptitlerin biyolojik aktivitesi, belirli AA'ların varlığına ve bunların peptit dizisindeki spesifik konumlarına bağlanabilir. Çalışmamızda, LPK-G ve LPK-Gİ'den tanımlanan bazı peptitler N-terminalinde hidrofobik AA'lar (Ile, Leu ve Val) ve C-terminalinde aromatik bir AA (Phe) içeriyordu ve bunlar ACE inhibitör aktivitesine katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca, tez çalışmamızda belirlenen AVLSL peptiti dört hidrofobik rezidü (A, V ve L) ve bir hidrofilik rezidü (S) içermektedir ve AVL peptiti daha önce Matsui vd. (2002) tarafından ACE inhibitörü olarak rapor

edilmiştir. YALPHAIL peptiti altı hidrofobik AA rezidüsü ve bir hidrofilik rezidüden (H) ve bir aromatik rezidüden (Y) oluşmaktadır ve Wako vd. (1996) tarafından ACE inhibitörü olarak rapor edilen YALPHA peptitini içermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında izoelektrik noktada çöktürme yaklaşımı kullanılarak limpet protein konsantresi elde edilmiş ve *in vitro* gastrointestinal sindirimin (INFOGEST) fizikokimyasal ve *in vitro* biyoaktif özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, *P. vulgata* etinden protein izolasyonu konusunda daha önce herhangi bir rapora rastlanmamıştır. LPK yüksek oranda EAA (%41.07) içerdiği ve iyi bir besinsel kaliteye sahip olduğu belirlenmiştir. LPK-G ve LPK-Gİ başlangıç materyali olan LPK'ya göre gelişmiş ORAC, FRAP, ABTS ve ACE inhibitör aktiviteleri göstermiştir. Daha önce hiçbir çalışmada limpet etinden *in vitro* gastrointestinal sindirim ile elde edilen ile bu biyolojik aktiviteler rapor edilmemiştir. LC-MS/MS, LPK-G ve LPC-Gİ hidrolizatlarındaki proteinlerden türetilmiş peptitlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. *De novo* peptit tanımlama yaklaşımı kullanılarak LPK-G için 7 ve LPK-Gİ için 6 olmak üzere toplam 13 peptit tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitler çoğunlukla hidrofobik, dallı zincirli ve aromatik AA rezidüleri içermektedir ve bu özellikler ACE inhibisyonu ve antioksidan aktivitelerle ilişkilendirilmiştir. LPK, bir dizi şifrelenmiş biyoaktif peptit dizisi içeren, insan tüketimi için umut verici bir yüksek kaliteli deniz proteini kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla, elde edilen LPK, LPK-G ve LPK-Gİ gibi doğal ürünler gıda veya nutrasötik formülasyonlarda kullanıma potansiyeline sahiptir. Antioksidan ve ACE inhibisyon aktiviteleri hakkında daha detaylı *in vivo* çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Ayrıca, bu tez çalışmasında, gıda sınıfı proteolitik enzimler olan Alkalaz ve Flavourzyme kullanılarak enzimatik hidroliz yoluyla üretilen limpet protein hidrolizatlarının ACE ve DPP-IV inhibitör aktivitesi ve antioksidan aktivite gibi geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olduğunu ilk kez göstermektedir. Tüm hidroliz süreci boyunca, Alkalaz ile üretilen hidrolizatların antioksidan aktiviteleri, artan inkübasyon süresiyle birlikte kademeli olarak artmıştır. Alkalaz ile üretilen protein hidrolizatları, Flavourzyme ile üretilen protein hidrolizatlarına kıyasla daha yüksek hidroliz derecesi ve daha yüksek ORAC, FRAP, ABTS ve DPP-IV ve ACE inhibitör aktiviteleri göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, limpet etinden enzimatik hidroliz yoluyla Tip-2 diyabet ve hipertansiyon hastalıklarıyla ilgili ACE ve DPP-IV inhibitörlerinin yanı sıra sadece farmakoloji için değil aynı zamanda gıda endüstrileri için de yüksek potansiyele sahip doğal antioksidanlar üretmenin mümkün olduğunu

göstermektedir. Bununla birlikte, saflığı arttırmak ve gözlemlenen biyolojik aktivitelerden sorumlu biyoaktif peptitleri tanımlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Son olarak, ülkemizde bulunan limpet türlerinin de gelecekteki çalışmalara dahil edilerek, elde edilecek biyoaktif peptit bileşenlerinin hem *in vitro* hücre kültürü deneylerinde hem de *in vivo* hayvan deneylerinde analiz edilmesi ve sonuçların sağladığı faydaların pazarlama ve ekonomik çalışmalarla ilgili bilgilendirme için değerlendirilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdul-Hamid, A., Bakar, J., and Bee, G. H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, 78(1), 69-74.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier applied science publishers.
- Ahhmed, A. M., and Muguruma, M. (2010). A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat science*, 86(1), 110-118.
- Ahn, B. N., and Kim, S. K. (2013). Muscle Proteins of Fish and Their Functions. In S. K. Kim (Ed.), *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications* (pp. 641-645). John Wiley & Sons.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M., and Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.
- Aluko, R. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In *Proteins in food processing* (pp. 389-412). Elsevier.
- Anal, A. K., Noomhorm, A., and Vongsawasdi, P. (2013). Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives. *Marine proteins and peptides: Biological activities and applications*, 709-735.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemistry* (18th ed.). AOAC International.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Aristoy, M. C., and Toldrá, F. (2004). Amino Acids. In L. M. Nollet (Ed.), *Handbook of Food Analysis* (Vol. 1: Physical Characterization and Nutrient Analysis, pp. 83-123). CRC Press.
- Asha, K., Kumari, K. R., Kumar, K. A., Chatterjee, N. S., Anandan, R., and Mathew, S. (2016). Sequence determination of an antioxidant peptide obtained by enzymatic hydrolysis of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22(3), 421-433.
- Asha, K. K., Remya Kumari, K. R., Ashok Kumar, K., Chatterjee, N. S., Anandan, R., and Mathew, S. (2016). Sequence determination of an antioxidant peptide obtained by enzymatic hydrolysis of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22, 421-433.
- Atallah, N., Deracinois, B., Boulier, A., Baniel, A., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Ravallec, R., Flahaut, C., and Cudennec, B. (2020). In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods*, 9(11), 1580.
- Avila, C. (2006). Molluscan natural products as biological models: chemical ecology, histology, and laboratory culture. In G. Cimino, Gavagnin, M. (Ed.), *Molluscs: From Chemo-ecological Study to Biotechnological Application* (Vol. 23, pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Bechaux, J., Gatellier, P., Le Page, J.-F., Drillet, Y., and Sante-Lhoutellier, V. (2019). A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food & Function*, 10(10), 6244-6266.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., Belitz, H.-D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2004). Fish, whales, crustaceans, mollusks. *Food Chemistry*, 619-642.
- Benkendorff, K. (2010). Molluscan biological and chemical diversity: Secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. *Biological Reviews*, 85(4), 757-775.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., and Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 139-150.
- Bleakley, S. (2018). Cereal Proteins: Potential Health Applications and Allergenicities. *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals, and Agriculture: Sources, Applications, and Advances*, 77.
- Bleakley, S., and Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 33.
- Borrajó, P., Pateiro, M., Barba, F. J., Mora, L., Franco, D., Toldrá, F., and Lorenzo, J. M. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. *Food Analytical Methods*, 12, 2401-2415.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., and Carrière, F. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014.
- Burgos-Rubio, V., De la Rosa, J., Altamirano, M., and Espinosa, F. (2015). The role of patellid limpets as omnivorous grazers: a new insight into intertidal ecology. *Marine Biology*, 162(10), 2093-2106.
- Cepero-Betancourt, Y., Oliva-Moresco, P., Pasten-Contreras, A., Tabilo-Munizaga, G., Pérez-Won, M., Moreno-Osorio, L., and Lemus-Mondaca, R. (2017). Effect of drying process assisted by high-pressure impregnation on protein quality and digestibility in red abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3744-3751.
- Cermeño, M., Bascón, C., Amigo-Benavent, M., Felix, M., and FitzGerald, R. J. (2022). Identification of peptides from edible silkworm pupae (*Bombyx mori*) protein hydrolysates with antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 92, 105052.
- Cermeño, M., FitzGerald, R. J., and O'Brien, N. M. (2016). In vitro antioxidant and immunomodulatory activity of transglutaminase-treated sodium caseinate hydrolysates. *International Dairy Journal*, 63, 107-114.
- Cermeño, M., O'Brien, N., and FitzGerald, R. J. (2018). Angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activities of transglutaminase treated sodium caseinate hydrolysates. *International Dairy Journal*, 78, 85-91.
- Chai, T.-T., Law, Y.-C., Wong, F.-C., and Kim, S.-K. (2017). Enzyme-assisted discovery of antioxidant peptides from edible marine invertebrates: A review. *Marine Drugs*, 15(2), 42.
- Cheng, S., Tu, M., Chen, H., Xu, Z., Wang, Z., Liu, H., Zhao, G., Zhu, B., and Du, M. (2018). Identification and inhibitory activity against α -thrombin of a novel anticoagulant peptide derived from oyster (*Crassostrea gigas*) protein. *Food & Function*, 9(12), 6391-6400.
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B., and Wong, J. H. (2015). Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine Drugs*, 13(7), 4006-4043.

- Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, T., and Ding, G.-F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, 301-313.
- Commission, E. (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off. J. Eur. Union*, 54(1; p. 2–54).
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., and Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100047.
- Cunha, S. A., and Pintado, M. E. (2022). Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 348-370.
- Dare, P., and Edwards, D. (1975). Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy Estuary, North Wales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 18(2), 89-97.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., and Lopez-Fandino, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- Dayal, J. S., Ponniah, A., Khan, H. I., Babu, E. M., Ambasankar, K., and Vasagam, K. K. (2013). Shrimps—a nutritional perspective. *Current Science*, 1487-1491.
- De Marchi, L., Mainente, F., Leonardi, M., Scheurer, S., Wangorsch, A., Mahler, V., Pilolli, R., Sorio, D., and Zoccatelli, G. (2021). Allergenicity assessment of the edible cricket *Acheta domesticus* in terms of thermal and gastrointestinal processing and IgE cross-reactivity with shrimp. *Food Chemistry*, 359, 129878.
- Delany, J., Myers, A., and McGrath, D. (1998). Recruitment, immigration and population structure of two coexisting limpet species in mid-shore tidepools, on the West Coast of Ireland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221(2), 221-230.
- Desai, A. S., Brennan, M. A., and Brennan, C. S. (2018). Amino acid and fatty acid profile and digestible indispensable amino acid score of pasta fortified with salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) powder. *European Food Research and Technology*, 244, 1729-1739.
- Dhanabalan, V., Xavier, M., Kannuchamy, N., Asha, K. K., Singh, C. B., and Balange, A. (2017). Effect of processing conditions on degree of hydrolysis, ACE inhibition, and antioxidant activities of protein hydrolysate from *Acetes indicus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(26), 21222-21232.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., and Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Dillen, L., and Cuyckens, F. (2013). Quantitative Analysis of Peptides with Mass Spectrometry: Selected Reaction Monitoring or High-Resolution Full Scan? *Mass spectrometry for drug discovery and drug development*, 403-425.
- Diniz, G. S., Barbarino, E., Oiano-Neto, J., Pacheco, S., and Lourenço, S. O. (2014). Proximate composition of marine invertebrates from tropical coastal waters, with emphasis on the relationship between nitrogen and protein contents. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(2), 332-352.
- Dupont, D., Croguennec, T., Brodkorb, A., and Kouaouci, R. (2013). Quantitation of proteins in milk and milk products. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 87-134). Springer.

- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., and Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820-1831.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., and Ross, R. P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chemistry*, 245, 698-706.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., and Clemente, A. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.
- Ewert, J., Eisele, T., and Stressler, T. (2022). Enzymatic production and analysis of antioxidative protein hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 248(8), 2167-2184.
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H.-C., Shigematsu, T., Kida, K., and Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.
- FAO. (2021). *FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire*.
- FAO, C. E. (2011). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. *FAO Food Nutr. Pap*, 92, 1-66.
- FAO/WHO. (1991). Protein quality evaluation, Report of joint FAO/WHO Expert Consultation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 51, 1-66.
- Fekete, S., Veuthey, J.-L., and Guillarme, D. (2012). New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69, 9-27.
- Fernandes, I., Fernandes, T., and Cordeiro, N. (2019). Nutritional value and fatty acid profile of two wild edible limpets from the Madeira Archipelago. *European Food Research and Technology*, 245(4), 895-905.
- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., and Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry*, 9(13), 2583-2593.
- Firth, L. B., Grant, L. M., Crowe, T. P., Ellis, J. S., Wiler, C., Convery, C., and O'Connor, N. E. (2017). Factors affecting the prevalence of the trematode parasite *Echinostephilla patellae* (Lebour, 1911) in the limpet *Patella vulgata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 492, 99-104.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., and Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.
- Gauthier, S., Vachon, C., and Savoie, L. (1986). Enzymatic conditions of an in vitro method to study protein digestion. *Journal of Food Science*, 51(4), 960-964.
- Gehring, C., Gigliotti, J., Moritz, J., Tou, J., and Jaczynski, J. (2011). Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 422-431.
- Ghaly, A., Ramakrishnan, V., Brooks, M., Budge, S., and Dave, D. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins. *Amino acids and oils: A critical review. J. Microb. Biochem. Technol*, 5(4), 107-129.
- Gigliotti, J. C., Jaczynski, J., and Tou, J. (2008). Determination of the nutritional value, protein quality and safety of krill protein concentrate isolated using an isoelectric solubilization/precipitation technique. *Food Chemistry*, 111(1), 209-214.

- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., and Andrade, P. B. (2015). Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*, 13(5), 3182-3230.
- Guérard, F., Guimas, L., and Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 19, 489-498.
- Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6-24.
- Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2013a). Bioactive proteins and peptides from macroalgae, fish, shellfish and marine processing waste. In *Marine proteins and peptides: Biological activities and applications* (pp. 5-39).
- Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2013b). In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates. *Journal of applied phycology*, 25(6), 1793-1803.
- Harnedy, P. A., Parthsarathy, V., McLaughlin, C. M., O'Keeffe, M. B., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., O'Harte, F. P., and FitzGerald, R. J. (2018a). Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. *Food Research International*, 106, 598-606.
- Harnedy, P. A., Parthsarathy, V., McLaughlin, C. M., O'Keeffe, M. B., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., O'Harte, F. P., and FitzGerald, R. J. (2018b). Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties. *Journal of Functional Foods*, 40, 137-145.
- Hayes, M. (2018). Bioavailability, bioaccessibility, and nutritional measurement of proteins. *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture: Sources, Applications and Advances*, 183-195.
- He, S., Franco, C., and Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289-297.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., and Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 1-7.
- Helkar, P. B., Sahoo, A. K., and Patil, N. (2016). Review: Food industry by-products used as a functional food ingredients. *International journal of waste resources*, 6(3), 1-6.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., and Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.
- Hultin, H., and Kelleher, S. (1999). *Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition US Patent 6,005,073*.
- Hultin, H. O., and Kelleher, S. D. (2000). *High efficiency alkaline protein extraction*.
- Hwang, J.-W., Lee, S.-J., Kim, Y.-S., Kim, E.-K., Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., and Park, P.-J. (2012). Purification and characterization of a novel peptide with

- inhibitory effects on colitis induced mice by dextran sulfate sodium from enzymatic hydrolysates of *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 993-999.
- IDF. (1993). *Milk, Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10 ed.). International Diabetes Federation.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., and Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
- Jayaprakash, R., and Perera, C. O. (2020). Partial purification and characterization of bioactive peptides from cooked New Zealand green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates. *Foods*, 9(7), 879.
- Je, J.-Y., Park, J.-Y., Jung, W.-K., Park, P.-J., and Kim, S.-K. (2005). Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry*, 90(4), 809-814.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Byun, H.-G., Jung, W.-K., and Kim, S.-K. (2005). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresource Technology*, 96(14), 1624-1629.
- Je, J.-Y., Park, S. Y., Hwang, J.-Y., and Ahn, C.-B. (2015). Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 16, 94-103.
- Jeon, Y. J., and Samarakoon, K. (2013). Recovery of Proteins and Their Biofunctionalities from Marine Algae. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 253-269.
- Jiang, S., Liu, L., Xu, J., Zeng, M., and Zhao, Y. (2019). Amino acid composition and digestibility of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) proteins isolated from different parts. *LWT*, 116, 108591.
- Jung, W.-K., Qian, Z.-J., Lee, S.-H., Choi, S. Y., Sung, N. J., Byun, H.-G., and Kim, S.-K. (2007). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytilus coruscus*. *Journal of Medicinal Food*, 10(1), 197-202.
- Kannel, W., and Higgins, M. (1990). Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 8(5), S3-8.
- Karnjanapratum, S., Benjakul, S., Kishimura, H., and Tsai, Y.-H. (2013). Chemical compositions and nutritional value of Asian hard clam (*Meretrix lusoria*) from the coast of Andaman Sea. *Food Chemistry*, 141(4), 4138-4145.
- Khalesi, M., and FitzGerald, R. J. (2021). In Vitro Digestibility and Antioxidant Activity of Plant Protein Isolate and Milk Protein Concentrate Blends. *Catalysts*, 11(7), 787.
- Khan, B. M., and Liu, Y. (2019). Marine mollusks: Food with benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 548-564.
- Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Kweon, H. J., Bahk, Y. Y., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., and Park, P.-J. (2013). A novel bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of *Ruditapes philippinarum*: Purification and investigation of its free-radical quenching potential. *Process Biochemistry*, 48(2), 325-330.
- Kim, E.-K., Joung, H.-J., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Moon, S.-H., Song, B. C., and Park, P.-J. (2012). Purification of a novel anticancer peptide from

- enzymatic hydrolysate of *Mytilus coruscus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1381-1387.
- Kim, E.-K., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Kang, S. H., Choi, D.-K., Lee, K.-H., Lee, J. S., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., and Park, P.-J. (2013). Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6), 1416-1420.
- Kim, H.-S., Je, J.-G., Ryu, B., Kang, N., Shanura Fernando, I., Jayawardena, T. U., Asanka Sanjeewa, K., Oh, J.-Y., Lee, T.-G., and Jeon, Y.-J. (2019). Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from *Hippocampus abdominalis*. *European Food Research and Technology*, 245, 479-487.
- Kim, S.-K., and Pallela, R. (2012). Medicinal foods from marine animals: current status and prospects. In S.-K. Kim (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 65, pp. 1-9).
- Kim, S.-K., and Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.
- Kleekayai, T., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., Poyarkov, A. A., Cunha Neves, A., Suntornsuk, W., and FitzGerald, R. J. (2015). Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. *Food Chemistry*, 176, 441-447.
- Ko, S.-C., Lee, D.-S., Park, W. S., Yoo, J. S., Yim, M.-J., Qian, Z.-J., Lee, C.-M., Oh, J., Jung, W.-K., and Choi, I.-W. (2016). Anti-allergic effects of a nonameric peptide isolated from the intestine gastrointestinal digests of abalone (*Haliotis discus hannai*) in activated HMC-1 human mast cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1), 243-250.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppäla, A., Rantamäki, P., and Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 9(8-9), 307-319.
- Kristinsson, H. G., and Liang, Y. (2006). Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) muscle proteins. *Journal of Food Science*, 71(5), C304-C312.
- Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81.
- Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., Demir, N., and Ingadottir, B. (2005). A comparative study between acid-and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. *Journal of Food Science*, 70(4), C298-C306.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2015). Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry*, 173, 847-854.
- Lee, S.-J., Kim, E.-K., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Lee, K. H., Choi, D.-K., Kang, H., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., and Park, P.-J. (2012). Purification and characterization of a nitric oxide inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1660-1666.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. d. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., and Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 950.

- Lemieux, L., Piot, J.-M., Guillochon, D., and Amiot, J. (1991). Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *Chromatographia*, 32, 499-504.
- Li-Chan, E. C., Hunag, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., and Hsu, K.-C. (2012). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.
- Li, G.-H., Le, G.-W., Shi, Y.-H., and Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7), 469-486.
- Li, G., Li, J., and Li, D. (2010). Seasonal variation in nutrient composition of *Mytilus coruscus* from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7831-7837.
- Linehan, L. G., O'Connor, T., and Burnell, G. (1999). Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry*, 64(2), 211-214.
- Liu, C., Zhou, H., Su, Y.-C., Li, Y., and Li, J. (2009). Chemical compositions and functional properties of protein isolated from by-product of triangle shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *Journal of aquatic food product technology*, 18(3), 193-208.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Manguy, J., Jehl, P., Dillon, E. T., Davey, N. E., Shields, D. C., and Holton, T. A. (2017). Peptigram: a web-based application for peptidomics data visualization. *Journal of Proteome Research*, 16(2), 712-719.
- Margulis, B. A., and Pinaev, G. P. (1976). The species specificity of the contractile protein composition of the bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*.
- Marmon, S. K., and Undeland, I. (2010). Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10480-10486.
- Matsui, T., Yukiyoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H., and Matsumoto, K. (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(2), 80-86.
- Matveyenko, A. V., Dry, S., Cox, H. I., Moshtaghian, A., Gurlo, T., Galasso, R., Butler, A. E., and Butler, P. C. (2009). Beneficial endocrine but adverse exocrine effects of sitagliptin in the human islet amyloid polypeptide transgenic rat model of type 2 diabetes: interactions with metformin. *Diabetes*, 58(7), 1604-1615.
- McCarthy, M., Woosnam, P., and Culloty, S. (2008). Histological investigation of the reproductive cycles of the limpets *Patella vulgata* and *Patella ulyssiponensis*. *Marine Biology*, 153(5), 871-877.
- Meisel, H., Walsh, D., Murray, B., and FitzGerald, R. (2006). ACE inhibitory peptides. *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, 269-315.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G., and Kim, S.-K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., and Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.

- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henchion, M., O'Neill, E., and Drummond, L. (2017). Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, 132, 90-98.
- Murray, J., and Burt, J. (2001). The Composition of Fish (Torry Advisory Note No. 38). *Aberdeen, UK: Torry Research Station*.
- Naik, A. S., Mora, L., and Hayes, M. (2020). Characterisation of seasonal *Mytilus edulis* by-products and generation of bioactive hydrolysates. *Applied Sciences*, 10(19), 6892.
- Nam, B.-H., Seo, J.-K., Lee, M. J., Kim, Y.-O., Kim, D.-G., An, C. M., and Park, N. G. (2015). Functional analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) β -thymosin: focus on antimicrobial activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), 167-174.
- Nasri, M. (2017). Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 81, 109-159.
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2016a). Angiotensin Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory, and Antioxidant Activities of a Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Meat Protein Extract and Its Hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(8), 1221-1233.
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J. (2016b). Marine processing proteinaceous by-products: A source of biofunctional food ingredients. In *Protein Byproducts* (pp. 63-86). Elsevier.
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O'Keeffe, M. B., and FitzGerald, R. J. (2017). Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 218, 396-405.
- Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Wijesekara, I., and Kim, S.-K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 378-383.
- Nolsøe, H., and Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 1-27.
- Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2012). Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. *Peptides*, 37(2), 263-272.
- Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal*, 32(1), 33-39.
- Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2017a). Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12451.
- Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2017b). Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 289-305.
- Norris, R., Casey, F., FitzGerald, R. J., Shields, D., and Mooney, C. (2012). Predictive modelling of angiotensin converting enzyme inhibitory dipeptides. *Food Chemistry*, 133(4), 1349-1354.
- O'Keeffe, M. B., Norris, R., Alashi, M. A., Aluko, R. E., and FitzGerald, R. J. (2017). Peptide identification in a porcine gelatin prolyl endoproteinase hydrolysate with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and hypotensive activity. *Journal of Functional Foods*, 34, 77-88.

- Oh, R., Lee, M. J., Kim, Y.-O., Nam, B.-H., Kong, H. J., Kim, J.-W., Park, J.-y., Seo, J.-K., and Kim, D.-G. (2020). Myticusin-beta, antimicrobial peptide from the marine bivalve, *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 342-352.
- Oh, Y., Ahn, C.-B., Nam, K.-H., Kim, Y.-K., Yoon, N. Y., and Je, J.-Y. (2019). Amino acid composition, antioxidant, and cytoprotective effect of blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate through the inhibition of caspase-3 activation in oxidative stress-mediated endothelial cell injury. *Marine Drugs*, 17(2), 135.
- Oseguera-Toledo, M. E., González de Mejía, E., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., and Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides: mechanisms of action on diabetes management. *Nutrafoods*, 13, 147-157.
- Oshima, G., Shimabukuro, H., and Nagasawa, K. (1979). Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 566(1), 128-137.
- Park, S. Y., Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., and Je, J.-Y. (2016). Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. *Journal of Functional Foods*, 20, 88-95.
- Parthiban, F., Shakila, R. J., Jeyasekaran, G., and Shalini, R. (2017). Relationship between antioxidative potential and amino acids composition of the bioactive peptides prepared from Indian squid *Uroteuthis (Photololigo) duvaucelii* (d'Orbigny, 1835) using alcalase. *INDIAN JOURNAL OF FISHERIES*, 64, 130-138.
- Porzio, M., and Pearson, A. (1977). Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 490(1), 27-34.
- Power, O., Nongonierma, A., Jakeman, P., and FitzGerald, R. (2014). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(1), 34-46.
- Promintzer, M., and Krebs, M. (2006). Effects of dietary protein on glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4), 463-468.
- Pujiastuti, D. Y., Ghoyatul Amin, M. N., Alamsjah, M. A., and Hsu, J.-L. (2019). Marine organisms as potential sources of bioactive peptides that inhibit the activity of angiotensin I-converting enzyme: a review. *Molecules*, 24(14), 2541.
- Pundir, S., Magrane, M., Martin, M. J., O'Donovan, C., and Consortium, U. (2015). Searching and navigating UniProt databases. *Current protocols in bioinformatics*, 50(1), 1.27. 21-21.27. 10.
- Qian, Z.-J., Je, J.-Y., and Kim, S.-K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8398-8403.
- Qian, Z.-J., Jung, W.-K., Byun, H.-G., and Kim, S.-K. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*, 99(9), 3365-3371.
- Qian, Z.-J., Zhang, Y. Y., Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Park, W. S., Choi, I.-W., and Jung, W.-K. (2018). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibition effects and antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats of peptide isolated from boiled abalone by-products, *Haliotis discus hannai*. *Journal of aquatic food product technology*, 27(9), 946-960.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.-G., and Kim, S.-K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.

- Ranawana, V., and Kaur, B. (2013). Role of proteins in insulin secretion and glycemic control. *Advances in Food and Nutrition Research*, 70, 1-47.
- Reguera, P., Couceiro, L., and Fernández, N. (2018). A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp.(Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 593-600.
- Rho, S. J., Lee, J.-S., Chung, Y. I., Kim, Y.-W., and Lee, H. G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44(4), 490-493.
- Ruppert, E. E., Barnes, R. D., and Fox, R. S. (2004). *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*.
- Samaranayaka, A. G., Kitts, D. D., and Li-Chan, E. C. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1535-1542.
- Santhanam, R. (2018). *Biology and ecology of edible marine gastropod molluscs*. CRC Press.
- Santini, G., Thompson, R. C., Jenkins, S. R., Chelazzi, G., Hartnoll, R. G., Kay, S. M., and Hawkins, S. J. (2019). Barnacle cover modifies foraging behaviour of the intertidal limpet *Patella vulgata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(8), 1779-1786.
- Sarmadi, B. H., and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Sasaki, C., Tamura, S., Tohse, R., Fujita, S., Kikuchi, M., Asada, C., and Nakamura, Y. (2019). Isolation and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from pearl oyster (*Pinctada fucata*) shell protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, 77, 137-142.
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Nutrition*, 130(7), 1865S-1867S.
- Shahidi, F., and Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Sheih, I.-C., Fang, T. J., and Wu, T.-K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 115(1), 279-284.
- 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*, 58(2), 1202-1207.
- Sheih, I.-C., Wu, T.-K., and Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, 100(13), 3419-3425.
- Sila, A., and Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26.
- Silva, V. M., Park, K. J., and Hubinger, M. D. (2010). Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. *Journal of Food Science*, 75(1), C36-C42.
- Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., and FitzGerald, R. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453.

- Spellman, D., O'cuinn, G., and FitzGerald, R. (2009). Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*, 114(2), 440-446.
- Sudhakar, S., and Nazeer, R. A. (2015). Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species. *Journal of Functional Foods*, 14, 502-512.
- Suleria, H. A. R., Osborne, S., Masci, P., and Gobe, G. (2015). Marine-based nutraceuticals: An innovative trend in the food and supplement industries. *Marine Drugs*, 13(10), 6336-6351.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C., and Mbanya, J. C. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119.
- Surasani, V. K. R. (2018). Acid and alkaline solubilization (pH shift) process: a better approach for the utilization of fish processing waste and by-products. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(19), 18345-18363.
- Surasani, V. K. R., Mandal, A., and Pandey, A. (2018). Utilization of freshwater mussel (*Lamellidens marginalis*) for the isolation of proteins through pH shift processing: characterization of isolates. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(31), 31497-31507.
- Tahergorabi, R., and Jaczynski, J. (2016). Seafood proteins and human health. In *Fish and fish oil in health and disease prevention* (pp. 323-331). Elsevier.
- Tahergorabi, R., Matak, K. E., and Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 18, 746-756.
- Tapal, A., and Tikku, P. K. (2019). Nutritional and nutraceutical improvement by enzymatic modification of food proteins. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 471-481). Elsevier.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Toomer, O. T., Do, A. B., Fu, T. J., and Williams, K. M. (2015). Digestibility and immunoreactivity of shrimp extracts using an in vitro digestibility model with pepsin and pancreatin. *Journal of Food Science*, 80(7), T1633-T1639.
- Tsai, J.-S., Chen, J.-L., and Pan, B. S. (2008). ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry*, 43(7), 743-747.
- Tsai, J.-S., Lin, T., Chen, J., and Pan, B. (2006). The inhibitory effects of freshwater clam (*Corbicula fluminea*, Muller) muscle protein hydrolysates on angiotensin I converting enzyme. *Process Biochemistry*, 41(11), 2276-2281.
- Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., and Barba, F. J. (2021). Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. *Marine Drugs*, 19(2), 71.
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., and Balasubramanian, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), 343-353.
- Undeland, I., Kelleher, S. D., Hultin, H. O., McClements, J., and Thongraung, C. (2003). Consistency and solubility changes in herring (*Clupea harengus*) light muscle

- homogenates as a function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3992-3998.
- Vareltzis, K. (2000). Fish proteins from unexploited and underdeveloped sources. In *Developments in food science* (Vol. 41, pp. 133-159). Elsevier.
- Vareltzis, P. K., and Undeland, I. (2012). Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using an acid and alkaline solubilisation technique—process characteristics and functionality of the isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 3055-3064.
- Venugopal, V. (2009). Seafood proteins: Functional properties and protein supplements. *Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean*, 51-102.
- Venugopal, V., and Gopakumar, K. (2017). Shellfish: nutritive value, health benefits, and consumer safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1219-1242.
- Vijaykrishnaraj, M., and Prabhasankar, P. (2015). Marine protein hydrolysates: their present and future perspectives in food chemistry—a review. *Rsc Advances*, 5(44), 34864-34877.
- Vijaykrishnaraj, M., Roopa, B., and Prabhasankar, P. (2016). Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel flavour. *Food Chemistry*, 211, 715-725.
- Wako, Y., Ishikawa, S., and Muramoto, K. (1996). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(8), 1353-1355.
- Wang, B., and Li, B. (2017). Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model. *Food Chemistry*, 218, 1-8.
- Wang, B., Li, L., Chi, C.-F., Ma, J.-H., Luo, H.-Y., and Xu, Y.-f. (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1713-1719.
- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y., and Lin, B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 111(2), 302-308.
- Wang, Q., Li, W., He, Y., Ren, D., Kow, F., Song, L., and Yu, X. (2014). Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry*, 145, 991-996.
- Wang, Y., Chang, Y., Yin, L. a., Xue, Y., Li, Z., and Xue, C. (2016). A novel technological process of extracting l-tyrosine with low fluorine content from defatted antarctic krill (*Euphausia superba*) by-product by enzymatic hydrolysis. *food and bioprocess technology*, 9(4), 621-627.
- Weber, L. I., and Hawkins, S. J. (2002). Evolution of the limpet *Patella candei* d'Orbigny (Mollusca, Patellidae) in Atlantic archipelagos: human intervention and natural processes. *Biological Journal of the Linnean Society of London*, 77(3), 341-353.
- Whitaker, R. D., Altintzoglou, T., Lian, K., and Fernandez, E. N. (2021). Marine bioactive peptides in supplements and functional foods-A commercial perspective. *Current Pharmaceutical Design*, 27(11), 1353-1364.
- WHO/FAO/UNU. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition* (Vol. 935). World Health Organization.

- Wijesekara, I., and Kim, S.-K. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs*, 8(4), 1080-1093.
- Wu, H.-T., Jin, W.-G., Sun, S.-G., Li, X.-S., Duan, X.-H., Li, Y., Yang, Y.-T., Han, J.-R., and Zhu, B.-W. (2016). Identification of antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Patinopecten yessoensis*) female gonads. *European Food Research and Technology*, 242(5), 713-722.
- Xu, Z., Zhao, F., Chen, H., Xu, S., Fan, F., Shi, P., Tu, M., Wang, Z., and Du, M. (2019). Nutritional properties and osteogenic activity of enzymatic hydrolysates of proteins from the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Food & Function*, 10(12), 7745-7754.
- Yang, F.-j., Xu, C., Huang, M.-c., Qian, Y., Cai, X.-x., Xuan, C., Ming, D., Huang, J.-l., and Wang, S.-y. (2021). Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313-2332.
- Yang, X.-R., Qiu, Y.-T., Zhao, Y.-Q., Chi, C.-F., and Wang, B. (2019). Purification and characterization of antioxidant peptides derived from protein hydrolysate of the marine bivalve mollusk *Tergillarca granosa*. *Marine Drugs*, 17(5), 251.
- Yasothai, R., and Giriprasad, R. (2015). Acid/Alkaline solubilization method of processing protein. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(1), 96-100.
- Yu, C., Cha, Y., Wu, F., Xu, X., Qin, Y., Li, X., and Du, M. (2018). Effects of high-pressure homogenisation on structural and functional properties of mussel (*Mytilus edulis*) protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1157-1165.
- Yu, F., Zhang, Z., Luo, L., Zhu, J., Huang, F., Yang, Z., Tang, Y., and Ding, G. (2018). Identification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Cyclina sinensis*. *Marine Drugs*, 16(11), 411.
- Zarai, Z., Frikha, F., Balti, R., Miled, N., Gargouri, Y., and Mejdoub, H. (2011). Nutrient composition of the marine snail (*Hexaplex trunculus*) from the Tunisian Mediterranean coasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1265-1270.
- Zhang, Z., Su, G., Zhou, F., Lin, L., Liu, X., and Zhao, M. (2019). Alcalase-hydrolyzed oyster (*Crassostrea rivularis*) meat enhances antioxidant and aphrodisiac activities in normal male mice. *Food Research International*, 120, 178-187.
- Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J., and Zeng, M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 1028-1033.
- Zheng, H., Shiming, L., Gaozhan, X., Dingding, R., Wenhong, C., Chaohua, Z., and Jianjun, Y. (2021). Effect of heat pretreatment before isoelectric solubilisation/precipitation on the characteristics of Pacific oyster (*Crassostrea hongkongensis*) and Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 682-691.
- Zhu, Y.-S., and FitzGerald, R. (2010). Direct nanoHPLC-ESI-QTOF MS/MS analysis of tryptic caseinophosphopeptides. *Food Chemistry*, 123(3), 753-759.
- Zlatanov, S., Laskaridis, K., and Sagredos, A. (2009). Determination of proximate composition, fatty acid content and amino acid profile of five lesser-common sea organisms from the Mediterranean Sea. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(8), 1590-1594.
- Zou, T.-B., He, T.-P., Li, H.-B., Tang, H.-W., and Xia, E.-Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.

ÖZ GEÇMİŞ

Gürkan BİLİR, Manisa/Soma (Anadolu) Linyit Lisesi'ni bitirdikten sonra Uludağ Üniversitesi Karacabey Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi bölümünden 08.07.2009 tarihinde mezun olmuştur. 2010 yılında Dikey Geçiş Sınavı ile yerleştiği Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 2013 yılında mezun olmuştur. OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programını 07.02.2017 tarihinde tamamlamıştır. 2017-2018 Eğitim Öğretim Yılı Güz Dönemi Doktora eğitimine başlayan ve 2016 yılından bu yana Araştırma Görevlisi olarak görev yapan Gürkan BİLİR, iyi derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-3526-6610

Yayınlar:

1. **Bilir, G.**, Sariahmet, M., & Ekinici, D. (2023). Purification and Characterization of Glutathione Reductase Enzyme from *Arum maculatum* Leaf. *Black Sea Journal of Agriculture*, 6(3), 269-274.
2. Yakan, H., **Bilir, G.**, Çakmak, Ş., Taş, Ö., Karakullukçu, N. T., Soydan, E., ... & Ekinici, D. (2023). Inhibitory effects of sulfenimides on human and bovine carbonic anhydrase enzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 38(1), 2194573.
3. **Bilir, G.**, Khalesi, M., Cermeño, M., FitzGerald, R. J., & Ekinici, D. (2022). Extraction and Characterization of Protein Concentrates from Limpets (*Patella vulgata*) and Peptide Release Following Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(36), 11212-11223.
4. Soydan, E., Olcay, A. C., **Bilir, G.**, Taş, Ö., Şentürk, M., Ekinici, D., & Supuran, C. T. (2020). Investigation of pesticides on honey bee carbonic anhydrase inhibition. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 1923-1927.
5. Olcay, A. C., **Bilir, G.**, Taş, Ö., Deniz, M., & Ekinici, D. (2009). Partial Purification of β -glucosidase enzyme from soybean (*Glycine max*) and determination of inhibitory effects two quercetin derivatives on enzyme activity. *ISSN 1406-894X*, 1419.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. TÜBİTAK “2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu”, The Department of Biological Sciences, School of Natural Sciences, Faculty of Science and Engineering, University of Limerick, Limerick, IRELAND, Ph.D. Researcher, 2022.
2. Farklı Lignoselülozik Yapıya Sahip Samanlarda Lignin Peroksidaz Enzimi Kullanımının Yem Değeri Üzerine Etkisi (TÜBİTAK 3001, TOVAG 214O606, Bursiyer, 2015-2016).
3. TÜBİTAK “2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu” 2015-2016

