T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNSAN GASTROİNTESTİNAL KOŞULLARININ YEŞİL MERCİMEK PROTEİNLERİNİN *İN VİTRO* PROTEİN SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra HASSAS

Danışman: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN GASTROİNTESTİNAL KOŞULLARININ YEŞİL MERCİMEK PROTEİNLERİNİN *İN VİTRO* PROTEİN SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

ESRA HASSAS

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir

2022

Esra HASSAS tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İnsan gastrointestinal (Gİ) koşullarının yeşil mercimek proteinlerinin *in vitro* protein sindirilebilirliği üzerine etkisinin araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve .....tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı:

Raportör Üye:

Üye:

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "İnsan sindirim koşullarının yeşil mercimek proteinlerinin *in vitro* protein sindirilebilirliği üzerine etkisinin araştırılması" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... / 2022

Esra HASSAS

ÖZET

İNSAN GASTROİNTESTİNAL KOŞULLARININ YEŞİL MERCİMEK PROTEİNLERİNİN *İN VİTRO* PROTEİN SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HASSAS, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel Karakaya

XCIX 2022, 99 Sayfa

Bu tez çalışmasında dünya çapında tüketilen, protein, lif, karbonhidratlar, mineraller ve vitaminler açısından zengin sürdürülebilir bir kurubaklagil olan mercimek (*Lens culinaris*) üzerinde çalışılmıştır. Mercimekte bulunan tripsin inhibitörleri, kondanse tanenler ve polifenollerin protein sindirilirliğini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca mercimeğe uygulanan gıda işleme yöntemlerinin de protein sindirilirliği üzerine etkisi vardır. Özet olarak, gıda matrisi ve pişirme işlemi (ısıl işlem) etkisi üç farklı *in vitro* gastrointestinal (Gİ) senaryo (bebek, tokluk ve açlık) ile değerlendirilmiştir. Sindirim koşulları mercimekten izole edilen protein izolatına uygulanmış ve OPA analizi sonuçları gıda formunda tüketilen aynı sindirim koşulları ile sindirilmiş mercimek ve mercimek unu için elde edilen protein sindirilirliği ile kıyaslanarak gıda matrisinin etkisi ortaya konmuştur. Tüm sindirim protokollerinde mercimek proteini izolatında diğer örneklere kıyasla mide ve mide-ince bağırsaktaki protein hidrolizi sonuçları yüksek çıkmıştır. Isıl işlemin

mercimekteki protein hidrolizi/sindirimi üzerine etkisini belirlemek için pişmiş mercimek ile protein izolatı ve un halinde sindirime uğratılmış gıda için elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Pişmiş mercimekte ve mercimek proteini izolatında un örneğine göre proteolizin etkinliğinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Isıl işlemin ve izolat elde etme yönteminin proteolize olumlu katkısı olmuştur. Proteinlerin sindirilirliği ve açığa çıkan peptitler SDS-Page, LC-Q-TOF/MS ile karakterize edilmiştir. Sindirim sonucunda açığa çıkan peptitler incelendiğinde, ısıl işlemin ve izolat elde etme yönteminin uygulanması neticesinde pişmiş mercimek ve izolat örneklerinde daha fazla ve daha küçük molekül ağırlığına sahip peptitlerin serbest hale geçtiği bulunmuştur. Bebek sindirimindeki düşük enzim aktivitesi proteolizi olumsuz etkilemiştir. Dolayısıyla açığa çıkan peptitler daha yüksek moleküler ağırlıklı olmuştur. Ayrıca OPA analizi sonuçlarına göre, bebek sindiriminde ve açlık durumunda proteinlerin yavaş sindirildiği ve dolayısıyla midede kalma sürelerinin tokluk sindirim protokolüne göre daha uzun olduğu değerlendirilmiştir ve bu durum bu proteinlerin olası alerjen etkileri olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Protein profili, yetişkinlerde açlık ve tokluk durumunda *in vitro* sindirim, bebek koşullarında *in vitro* sindirim, protein hidrolizi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HUMAN GASTROINTESTINAL CONDITIONS ON THE *IN VITRO* PROTEIN DIGESTIBILITY OF LENTIL PROTEINS

HASSAS, Esra

MSc in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

XCIX 2022, 99 Pages

In this thesis, lentil (*Lens culinaris*), a sustainable legume that is consumed worldwide and rich in protein, fiber, carbohydrates, minerals, and vitamins, was studied. Trypsin inhibitors, condensed tannins, and polyphenols in lentils are known to affect protein digestibility. In addition, the food processing methods applied to lentils have an effect on protein digestibility. In summary, in the thesis, the effect of the food matrix and cooking process (heat treatment) was evaluated together with three different *in vitro* GI scenarios (infant, late, and early phase adult). Digestive conditions were applied to the protein isolate obtained from lentils and the results of OPA analysis were compared with the digestibility of protein in lentils and lentil flour and the positive effect on food matrix was revealed. In all digestion protocols, protein hydrolysis in both *in vitro* gastric and intestinal digestion, were higher in lentil protein isolate compared to other samples. To determine the effect of heat treatment on protein hydrolysis/digestion in lentils, the results obtained for protein isolate, lentil flour, and cooked lentil were compared. It was evaluated that the efficiency of proteolysis was higher in cooked lentils and lentil protein isolate compared to the flour sample. Results showed that the heat treatment and the isolation conditions were contributed positively to the proteolysis. The digestibility of the proteins and the resulting peptides were characterized by SDS-Page and

LC/Q-TOF/MS. Peptides released as a result of digestion were found more and having small molecular weights in cooked lentil and protein isolate samples as a result of the application of heat treatment and isolate obtaining method. Low enzyme activity in infant digestion negatively affected proteolysis. Therefore, the released peptides were classified as having a higher molecular weight. Furthermore, it was evaluated that the duration of stay in the stomach in infant digestion and in the late phase of adult digestion was shorter than the postprandial digestion protocol. It has been interpreted that it is in parallel with the allergenicity.

Keywords: Protein profile, *in vitro* digestion in late and early phase of adults, *in vitro* digestion in infant conditions, protein hydrolysis

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında mercimek proteini üzerine gıda matrisi ve pişirme işleminin (ısıl işlem) etkisi üç farklı *in vitro* gastrointestinal (Gİ) senaryo (bebek, tokluk ve açlık) ile değerlendirilmiştir. Sindirim koşulları mercimekten izole edilen protein izolatına uygulanmış ve elde edilen sonuçlar gıda formunda tüketilen mercimek ve mercimek unu için elde edilen protein hidrolizi/sindirilirliği ile kıyaslanarak gıda matrisinin etkisi ortaya konmuştur. Isıl işlemin mercimekteki protein hidrolizi/sindirilirliği üzerine etkisini belirlemek için mercimek protein izolatı ve un halinde *in vitro* sindirime uğratılmış gıda için elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve ısıl işlemin üç farklı Gİ koşulundaki etkisi ortaya konmuştur. Proteinlerin sindirilirliği ve açığa çıkan peptitler SDS-Page, LC/Q-TOF/MS ile karakterize edilmiştir. Ayrıca mide sindirimi sırasında farklı sürelerde örnek alınıp mercimek proteinlerinin hidroliz hızı OPA analizi ile belirlenmiştir ve dolayısıyla midede kalma süreleri hakkında bir fikir elde edilmiştir.

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sibel KARAKAYA'ya, tez çalışmamda FGA-2021-22680 proje numarası ile malzeme desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra HASSAS

…/…/2022

İZMİR

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLOLAR DİZİNİ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
^{o}C	Derece santigrat
mL	Mililitre
mg	Miligram
kg	Kilogram
mg/w	Hacim/ağırlık
g	Gram
M	Molar
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum di hidrojen fosfat
$NaHCO_3$	Sodyumbikarbonat
$MgCl_2(H2O)_6$	Magnezyum klorür hegza hidrat
$(NH_4)_2CO_3$	Amonyum karkarbonat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler	Açıklama
<	Küçük
>	Büyük
µg	Mikrogram
L	Litre
µmol	Mikromol
mmol	Milimol
pH	Power of Hydrogen
α	Alfa
β	Beta
ɣ	Gamma
ω	Omega
rpm	Dakikadaki devir sayısı
nm	Nanometre
v/v	Hacim/hacim
NaCl	Sodyum klorit

Simgeler	Açıklama
<	Küçük
>	Büyük
µg	Mikrogram
L	Litre
µmol	Mikromol
mmol	Milimol
pH	Power of Hydrogen
A	Alfa
B	Beta
ɣ	Gamma
ω	Omega
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Nm	Nanometre
v/v	Hacim/hacim
NaCl	Sodyum klorit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
ADE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-Page	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid Jel Elektroforez
SPSS	Statistical Package for the Social Science (IBM firmasının istatistik programı)

1. GİRİŞ

Gelişmekte olan ülkelerde nüfus ve orta sınıfın artışı nedeniyle hayvansal proteinlere olan talebin önümüzdeki 50 yıl içerisinde mevcut tüketiminin yaklaşık iki katına çıkması beklenmektedir. Bundan dolayı, bitki proteinlerinin gıdalardaki hayvansal proteinlerin kısmi ikamesi olarak kullanılmasına yönelik artan bir ilgi vardır. Bitkisel proteinlerin hayvansal proteinlere kıyasla bir veya daha fazla zorunlu aminoasitler bakımından eksik olması, daha düşük protein sindirilirliği, büyük moleküler ağırlıkları, boyutları ve zayıf çözünürlükleri, fiziksel işlevselliklerini en üst düzeye çıkarmadaki zorlukları, protein fraksiyonlarının izolasyonu ve geri kazanımı ile ilişkili ekonomik maliyetleri nedenleri ile insan gıdası olarak kullanımı sınırlı kalmıştır (Ainis et al, 2018; Roux et al., 2020).

Dünyada insan beslenmesinde bitkisel proteinlerin %22'sinin, karbonhidratların %7'sinin, hayvan beslenmesinde proteinlerin %38'inin ve karbonhidratların %5'inin yemeklik baklagillerden sağlandığı belirtilmektedir. Ayrıca, %18–32 oranında protein içeren yemeklik tane baklagiller, gelişmekte olan ülkelerin beslenme sorununun çözümünde ve beslenmedeki protein açığının giderilmesinde sıklıkla gündeme gelmektedir. Gelişmekte olan birçok ülkede baklagiller iyi birer protein, karbonhidrat, diyet lifi, vitamin, mineral ve yağ asidi kaynağı olarak diyetlerde yer almaktadır. Ayrıca gelişmişlik düzeyi düşük olan ülkelerde hem bebek ve çocukların hem de yetişkinlerin beslenmesinde sıklıkla yer almaktadır (Kün vd., 2004; Adak vd., 2009).

Bünyelerinde bulundurdukları sağlığa faydalı olan fitokimyasalların araştırıldığı birçok araştırma bulunmaktadır. Diyet lifleri, polifenoller ve diğer fitokimyasallar tohumda ve tohum kabuğunda bulunmaktadır. Ek olarak, baklagiller fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilecek çok iyi birer ham maddedir. Yüksek besleyici kalite, iyi tekno-fonksiyonel özellikler ve kabul edilebilir maliyet nedeniyle baklagil proteinleri hayvansal kaynaklı proteinlere potansiyel bir alternatif oluşturmaktadır. Sürdürülebilirlik ve sağlık nedenleriyle hayvansal protein kaynaklarına alternatif olarak tüketimini teşvik etmek için baklagillerin sindirilirliğini keşfetmeye artan bir ilgi vardır. Bununla birlikte,

gastro-intestinal sindirim sırasında bitkisel protein izolatlarının davranışı ve ayrıca dirençli peptitlerin peptidomik karakterizasyonu hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır (Akibode and Maredia, 2012; Alves and Tavares, 2019).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkisel Proteinler ve Baklagiller

Şu anda dünya nüfusu hızla artmakta ve bununla birlikte ağırlıklı olarak hayvansal kaynaklı diyet proteinine olan talebin, 2000 yılına kıyasla 2030 yılına kadar %50'den fazla artması beklenmektedir. Geleneksel batı diyeti modeli, protein gereksinimlerini karşılamak için ağırlıklı olarak hayvansal ürünlere odaklanmıştır. Bu diyet, doğal kaynakların tükenmesine sebebiyet veren yoğun hayvancılığa dayandığı için çevreye zarar vermektedir. Sağlık açısından bakıldığında ise, özellikle kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin yüksek olması, daha yüksek koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet (T2D) ve bazı kanser türleri ile de ilişkili bulunmuştur. Hem çevresel hem de sağlık nedenleriyle daha bitki temelli bir diyete geçişin acil ihtiyacını vurgulayan bir dizi çalışma bulunmaktadır (Pihlanto et al., 2017).

Bitkisel proteinler dünyanın birçok yerinde et yerine kullanılmakta ya da protein bakımından yetersiz beslenmenin azaltılması için uzun zamandır temel ve ucuz protein kaynağı olarak önerilmekte ve kullanılmaktadır. Günümüzde sürdürülebilir bir bitki proteini arzına ve insan beslenmesindeki başlıca bitkisel protein kaynağı olan baklagillere yönelik artan bir talep vardır. Baklagiller, nutrasötikler ve fonksiyonel gıda bileşenleri üretimi için iyi bir hammadde kaynağıdır. Baklagillerin hem besleyici hem de nutrasötik gıda temelli ürünler üretmek için işlenmesi, sağlık bilincine sahip pazar için büyük bir fırsatı temsil etmektedir (Gutiérrez-Uribe, 2016). Gelişmekte olan birçok ülkede düşük gelirli insanların önemli besin kaynakları arasında bulunan yemeklik baklagiller, Türkiye'de de pek çok ailenin günlük tüketiminde önemli yere sahiptir (Uzunöz, 2009). Toplam baklagil üretimi dikkate alındığında ise, Türkiye dünyanın en büyük üreticileri arasındadır (FAO, 2016).

Leguminosae (Fabaceae) ailesi, baklagiller olarak da bilinmekte, 751 cins ve 19.500 türden oluşan üçüncü büyük çiçekli bir bitki ailesidir. İnsan tüketimi için

kullanılan tohumlar bitkinin birincil kısmını oluşturmaktadır (Gutiérrez-Uribe, 2016). Baklagiller, proteinler, karbonhidratlar, diyet lifi ile vitaminler, mineraller ve yağ asitleri gibi mikro besin öğeleri için iyi bir kaynaktır. Baklagil tohumlarındaki toplam protein içeriğinin ortalama %80'i depo proteinleridir. Geri kalan proteinler ise anti-besleyici faktörler olarak adlandırılan proteaz inhibitörleri ve lektinlerdir. Lektinler karbonhidratları bağlayan proteinlerdir ve bezelye, nohut, mercimek, gibi işlenmemiş baklagillerde bulunurlar. Ancak lektinler ısıl işlem ile tahrip olur. Bu tohumlar çiğ olarak tüketildiğinde içerdikleri lektinler nedeniyle ishal, şişkinlik, kusma ve kırmızı kan hücrelerinde aglütinasyon gibi problemlere neden olabilirler. Bununla birlikte, lektinlerin bazı kanserlerin önlenmesinde ve bazı doğuştan gelen savunma mekanizmalarının aktivasyonunda kilit bir rol oynayabileceği de gösterilmiştir. Ayrıca obeziteyi önlemek veya kontrol etmek için terapötik ajanlar olarak değerlendirilmişlerdir (Sajjadi et al., 2014; Gutiérrez-Uribe, 2016).

Proteaz inhibitörleri ise besin öğelerinin sindirilirliğini ve biyoyararlılığını azaltmaktadırlar. Baklagil tohumları, başlıca iki gruba ayrılan birkaç proteaz inhibitörü içerir: Kunitz proteinleri ve Bowman-Birk proteinleri (BBI). Kunitz inhibitörleri, düşük sistein içeriği olan 18 ila 24 kDa'lık moleküler ağırlığa (MA) sahiptir ve iki disülfit köprüsü ile bağlanmış bir veya iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır (De Almeida Costa et al., 2006). Bowman-Birk inhibitörleri, yüksek sistein içeriği (14 kalıntı) ile 8 ila 10 kDa moleküler ağırlığa sahip tek bir zincirden oluşur; bu inhibitörler zincir içi disülfit köprüleri oluştururlar ve biri tripsin için diğeri kimotripsin için reaktif bölgelere sahiptirler ve bunlar bağlandığında bu enzimlerin aktivitesini azaltabilirler (Weder and Kahley 1998).

Bununla birlikte, Bowman-Birk inhibitörleri (BBI) gibi bazı proteaz inhibitörlerinin, epidemiyolojik, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara göre karsinojenezin başlamasını tersine çevirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, düzenli olarak kurubaklagil tüketimi, diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere bazı hastalıkların riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ek sağlık yararları sağlayabilecek diğer bileşenlere veya fitokimyasalların araştırılmasına artan bir ilgi vardır. Bazı Bowman-Birk inhibitörleri için antikarsinojenik ve antiinflamatuar aktiviteler gibi faydalı etkiler bildirilmiş olmasına rağmen, bunlar hakkında

endişeler vardır. Özellikle diyetteki protein sindirilirliğinin azalmasıyla ilgili olası anti-besleyici faktörlerin etkileri bu kaygıların başında yer almaktadır (Raggy et al., 2006). Dünya çapında sık tüketilen baklagil olan mercimek tohumları esas olarak Bowman–Birk tripsin inhibitörleri içermektedir. Mercimek tohumlarından 67 amino asit kalıntısından oluşan ve MA'sı 7.448 kDa olan bir tripsin/kimotripsin Bowman–Birk inhibitörü izole edilmiştir.

2.1.1. Mercimek

Mercimek, baklagiller familyasında yer alan *Lens* cinsine dahil dört türden biridir. *Lens* cinsi içinde bulunan tüm türler, mercek şekilleri ve yenilebilir tohumları sebebiyle topluca "mercimekler" olarak anılsa da *Lens culinaris* "mercimek" denildiğinde en çok akla gelen ve en sık tüketilen mercimek türüdür. Mercimek, yaklaşık 10.000 yıl önce Yakın Doğu'dan gelen eski bir baklagil bitkisidir. Kanada, Hindistan, Türkiye, Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri, Nepal, Çin ve Etiyopya küresel mercimek üretiminde önemli oyunculardır. Mercimek mahsulü ağırlıklı olarak dünyanın yarı kurak bölgelerinde uygun bir sulama sistemine ihtiyaç duymadan yetiştirilmektedir. Mercimek mahsulü, minimum yağış ve yüksek sıcaklıklar gibi aşırı çevresel koşulları tolere edebilir ve bu da onları ısınan dünyada gelişebilecek sürdürülebilir bir mahsul haline getirmektedir. Türkiye'de üretimi yapılan 9 çeşit kuru baklagilden en fazla yetiştirilenleri nohut, kuru fasulye ve mercimektir. Türkiye'de mercimek tüketimi incelendiğinde; yeşil mercimek tüketiminin günde kişi başına 0.5-0.6 kg arasında değiştiği görülmektedir (Gülaç, 2021).

Son yıllarda mercimek proteininin sağlık ve beslenme üzerindeki faydalı etkilerine ilgi artmıştır. Mercimek, yüksek besleyici değeri ile tanınan orta düzeyde enerji sağlayan bir gıdadır. Özellikle, mükemmel bir protein (%20-30), sağlıklı yağ (<2 g/100 g), karbonhidratlar (%40-60), diyet lifi ve çeşitli mikro besin öğelerinin kaynağı olarak bilinmektedir. 50 g mercimek, 3.7-4.5 mg demir, 2.2-2.7 mg çinko, 22-34 µg selenyum, 50-250 µg beta-karoten ve 216-290 µg folat sağlayabilmektedir. Diğer baklagillerden farklı olarak mercimekte, demir ve çinkoyu bağlayan ve dolayısıyla bu besin öğelerini biyolojik olarak yetersiz kılan fitik asit (2.5–4.4 mg/g) çok düşük miktarda bulunmaktadır (Boye et al., 2010; Siva-

Shankar et al., 2018). Mercimek proteini, diğer bakliyat proteinleri gibi, zorunlu amino asitler, özellikle lösin, lizin, treonin ve fenilalanin için iyi bir kaynaktır, ancak kükürt içeren zorunlu amino asitler metionin ve sistin eksiktir (Tablo 1). Bunun dışında mercimek fitokimyasallar da dahil olmak üzere besin öğesi olmayan bileşikleri içermektedir (Rochfort and Panozzo, 2007). Bunlara triterpinoidler, flavonoidler, inositol ve steroidler, fenolik asitler, saponinler ve tanenler gibi antioksidan bileşikler dahildir (Xu and Chang, 2010). Diyet lifleri ve polifenoller dahil olmak üzere fitokimyasalların çoğu tohum ve tohum kabuğunda bulunmaktadır (Hernandez-Salazar et al., 2010).

Mercimek tohumlarının yüksek protein içeriği, pahalı hayvansal protein ürünlerine gücü yetmeyen gelişmekte olan ülkelerdeki insanları beslemek için iyi bir kaynak olmasını sağlamaktadır. Mercimek, ete kıyasla düşük fiyatı nedeniyle "yoksul insan eti" olarak adlandırılmakta ve diyetin amino asit ve mikro besin öğesi gereksinimlerini dengeleyerek besleyici bir öğün sağlamada tahılları tamamlayarak diyetin besleyici değerini artırmaktadır (Tamaranatham and Mahadevamma, 2003; Abraham, 2015). Çözünürlük sınıflandırmasına göre baklagillerde bulunan başlıca proteinler, farklı gıda formülasyonlarında su tutma, yağ bağlama, köpürme ve jelleşme gibi işlevsel özellikler kazandıran globulinler ve albüminlerdir. Albüminler, moleküler ağırlıkları 5 ila 80 kDa arasında değişen suda çözünür proteinlerdir. Globulinler tuzda çözünen proteinlerdir ve baklagillerde bulunan başlıca türleri legumin (11S) ve visilindir (7S) (Schwenke, 2001). Albüminlerin ve globulinlerin, çözündürülmüş mercimek proteininin sırasıyla %19.6 ve %53.9'unu temsil ettiği gösterilmiştir (Bhatty, 1988). 11S globulin, mercimek proteinlerinin ana fraksiyonunu temsil eder (Boye et al., 2010; Swanson, 1990). Ayrıca mercimekte albumin, globulin, legumin, visilin, glutelin ve prolamin fraksiyonlarının moleküler kütleleri sırasıyla 20.2 kDa, 82.2 kDa, 14.6-92.6 kDa, 13.8-92.26 kDa, 20.2-82.2 kDa, 17.0-46.2 kDa ve 16.98-63.8 kDa'dur (Gupta and Dhillon, 1993).

Mercimek tohumları doğurganlık çağındaki kadınlar, büyüyen çocuklar ve vejetaryenler için de gerekli diyet lifi, B grubu vitaminleri ve demir gibi mineralleri içermelerinden dolayı önemlidir (Samaranakaya, 2017). Ayrıca mercimek, glisemik indeksi düşük (55 veya daha az) nişasta içerir ve kan şekeri seviyelerinin

korunmasını destekleyebilir. Mercimek unu glütensizdir ve mercimek gibi baklagiller çölyak hastaları için faydalı olduğu için diyetisyenler tarafından tavsiye edilmektedir. Baklagiller, Paleo döneminden beri vejeteryan beslenme tarzının bir parçası olmuştur. Mercimek, etin yerine demir ve protein seviyeleri nedeniyle vejetaryen diyetlerde kullanılmaktadır (Samaranayaka, 2017). Bunlara ek olarak, düşük yağ içeriği, mercimeğin sağlıklı beslenmenin bir parçası olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.

Tablo 1 Bazı baklagillerde bulunan zorunlu aminoasit miktarları ve diğer aminoasit kaynakları ile karşılaştırmaları (USA Dry Pea & Lentil Council Webinar)

Amino Asit	Mercimek g/100g protein	Bezelye g/100g protein	Nohut g/100g protein	Soya fasülyesi g/100g protein	Yumurta g/100g protein	Tam buğday g/100g protein	Esmer pirinç g/100g protein
Alanin	4.2	4.4	4.3	5.2	—	3.7	5.8
Arginin	7.7	8.9	9.4	8.6	6.2	4.9	7.6
Aspartik asit	11.1	11.8	11.8	14.0	11.0	5.5	9.4
Sistin	1.3	1.5	1.3	1.8	2.3	2.1	1.2
Glutamik asid	15.5	17.1	17.5	21.6	12.6	32.8	20.4
Glisin	4.1	4.4	4.2	5.2	4.2	4.3	4.9
Histidin	2.8	2.4	2.8	3.0	2.4	2.7	2.5
İzolösin	4.3	4.1	4.3	5.4	6.6	3.4	4.2
Lösin	7.3	7.2	7.1	9.1	8.8	6.8	8.3
Lisin	7.0	7.2	6.7	7.4	5.3	2.7	3.8
Metionin	0.9	1.0	1.3	1.5	3.2	1.7	2.3
Fenilalanin	4.9	4.6	5.4	5.8	5.8	5.2	5.2
Prolin	4.2	4.1	4.1	6.5	4.2	15.7	4.7
Serin	4.6	4.4	5.0	6.5	6.9	4.7	5.2
Treonin	3.6	3.6	3.7	4.8	5.0	2.8	3.7
Triptofan	0.9	1.1	1.0	1.6	1.7	1.3	1.3
Trosin	2.7	2.9	2.5	4.2	4.2	2.1	3.8
Valin	5.0	4.7	4.2	5.6	7.2	4.3	5.9

İnsan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinin yanı sıra, bitkisel gıdaların tüketimi, çoğunlukla yapraklar, kökler, soğanlar, meyveler ve tohumlar dahil olmak üzere çeşitli bitki kısımlarında bulunan toksik moleküller ve alerjen proteinlerin

varlığı ile ilişkili bazı zararlı etkilere neden olabilmektedir. Ayrıca, çeşitli yenilebilir bitki türlerinden elde edilen çiğ veya pişmiş gıdaların tüketiminin, hem çocuklarda hem de yetişkinlerde az veya çok şiddetli alerjik belirtileri tetiklemesi muhtemeldir. Son yirmi yılda, bu gıda alerjilerinden sorumlu bitki alerjenlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu açısından büyük ilerleme kaydedilmiştir (Barre et al., 2020). Mercimekte rapor edilen başlıca alerjen protein, gama-vicilin depo proteini olan 47 kDa molekül ağırlığına sahip Len c 1'dir. Buna ek olarak, tohuma özgü biyotinlenmiş proteine karşılık gelen 66 kDa'lık bir protein olan Len c 2 de rapor edilmiştir. Bu proteinlerin her ikisi de haşlanmış mercimekten izole edilmiştir. Mercimek ısıl işlemi, 12-16 kDa'lık düşük moleküler ağırlıklı bantlarda güçlü bir artış ve 25-45 kDa bantlarında bir azalma ile polipeptit profilinde ciddi değişiklikler göstermiştir. Ayrıca yeni bir baklagil alerjeni immünokimyasal olarak aktif Len c 3'ün mevcut olduğu da bildirilmiştir (Akkerdeas et al., 2012).

2.2. Gıda İşleme Yöntemlerinin Baklagil Proteinlerinin Sindirilirliği Üzerine Etkileri

Baklagil proteinleri, hayvansal protein kaynaklarıyla karşılaştırıldığında daha düşük sindirilirliğe sahiptir. Bu, öncelikle depo proteinlerinin büyük boyutundan ve tripsin inhibitörleri gibi anti-besleyici faktörlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Çiğ baklagillerin tüketimi zordur ve bağırsakta amino asit emilimi açısından verimsiz olabilmektedir. Baklagil proteinlerinin sindirilirliğini iyileştirmek mümkündür. Baklagil tüketimini başlı başına kolaylaştırmak için çeşitli yerel gıda işleme yöntemleri kullanılmaktadır. Besin değeri açısından ve protein kullanımının potansiyel gelişimini değerlendirmek için birkaç farklı baklagil türü ve gıda işleme tekniği araştırılmıştır. Baklagillerin sindirilirliğini ve besinsel kalitesini iyileştirmek için çeşitli ön işlem (örneğin ıslatma, çimlendirme, pişirme/kaynatma, kavurma, mikrodalga, fırınlama, otoklavlama ve ekstrüzyon) ve fraksiyonlama (örn. izoelektrik çökeltme [IEP]) teknikleri araştırılmıştır (Akıllıoğlu ve Karakaya, 2010; Aryee and Boye, 2016; Drulyte and Orlien, 2019).

Bitkisel proteinlerin sindirilirliğinin genellikle hayvansal proteinlerden daha düşük olması, bitki hücre duvarı bileşenleri uzaklaştırıldıktan sonra iyileştirilebilmektedir. İzoelektrik çökeltme (IEP), iyileştirilmiş sindirilirlik ile

daha yüksek saflıkta protein fraksiyonlarının üretimi için bir işleme tekniği olarak araştırılmıştır. Yüksek saflıkta protein fraksiyonları üretmek için baklagillerden ultrafiltrasyon veya izoelektrik yöntemler ile proteinler çöktürülmekte ve bu sayede bezelye protein izolatında %82, bezelye tohumlarında %64, çiğ mercimek ununda %77, mercimek protein izolatında %85, soya proteini izolatında ise %76'ya kadar çıkabilen sindirilirliğe ulaşılmıştır (Nguyen et al., 2015; Aryee et al., 2016). Farklı işleme prosedürlerinin proteinlerin hem yapısını hem de işlevselliğini etkileyeceği iyi bilindiğinden, işlemenin protein sindirilirliğini de etkileyebileceği tahmin edilmektedir.

Baklagil proteinlerinin besleyici değeri, bitki hücre duvarlarının karmaşıklığı ve fitatlar, polifenoller, tanenler ve tripsin inhibitörleri gibi anti-besin öğelerin mevcudiyeti nedeniyle sindirilirlikleri ile sınırlıdır (Avilés-Gaxiola et al., 2018). Fitik asit, mineral kofaktörleri, şelatlar, sindirim enzimlerinin aktivitesini düşürmektedir. Proteaz inhibitörleri, sindirim enzimlerine (tripsin, kimotripsin ve elastaz) bağlanabilen ve onları inaktive eden düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Tanenler, proteinlerle kompleksler oluşturabilen ve dolayısıyla protein sindirilirliğini düşürebilen suda çözünür polifenolik bileşiklerdir (Barbana et al., 2013). Ayrıca, nişasta ve protein içeren bir gıda matrisinde, lizin gibi bazik bir aminoasit, gıda hazırlama sırasında uzun süreli yüksek sıcaklıklar kullanıldığında sindirime dirençli formlara dönüşebilmektedir (Lund and Ray, 2017).

Baklagil proteinlerinin düşük sindirilirliği, ıslatma, fermantasyon, çimlendirme, kabuklarını ayırma, haşlama, basınçlı pişirme ve kavurma gibi farklı işleme ve hazırlık işlemleri yoluyla anti-besin öğelerin etkisi azaltılarak iyileştirilebilir. Pişirme/haşlama, protein kalitesini artırmak ve antinutrisyonel faktörleri azaltmak veya etkisiz hale getirmek için baklagillere uygulanan en basit ve iyi bilinen yöntemlerden biridir. Tablo 2'de görüldüğü gibi, gıda işlemenin baklagillerde *in vitro* protein sindirilirliği (İVPS) üzerindeki etkisi, çiğ baklagillerin protein sindirilirliğine kıyasla az da olsa bir öneme sahiptir. Yüzyıllar boyunca, insan tüketiminden önce baklagil tohumları, uygulama ve ekipmandaki basitlik nedeniyle geleneksel pişirme ile ıslatılmış ve ısıl işleme tabi tutulmuştur. Bu işleme yöntemlerinin çoğu evde yemek pişirmede sıklıkla kullanılır, ancak sindirilirliği

iyileştirmede küçük bir etkisi (~%10) olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, pişirme işleminin oldukça kontrolsüz ve ayarlanamayan bir süreç olması nedeniyle vitaminler gibi değerli besin öğelerinin potansiyel kaybı söz konusudur. Bu nedenle, ısıl işleminin daha iyi kontrol edilmesiyle protein sindirilirliğini optimize etmek için diğer işleme teknikleri araştırılmıştır (Linsberger-Martin et al., 2013).

Tablo 2 Gıda işleme yöntemlerinin baklagillerin sindirilirliği üzerine etkileri

İşleme teknikleri	Etkileri	Kaynak
Basınçlı pişirme	Basınçlı pişirmeden önce ıslatma işlemi, işlem süresini kısaltmanın yanı sıra *in vitro* protein sindirilirliğini (İVPS) %14-16 oranında iyileştirdiği için fasulye proteini sindirilirliğini olumlu yönde etkilemiştir. Sağlıklı Hintli yetişkinlerde çift kararlı izotop yöntemiyle ölçülen nohut ve sarı bezelyedeki lizinin sindirilirliği, basınçlı pişirme yöntemiyle pişirilip pirinçle birlikte yenildiğinde sırasıyla %60 ve %62 olarak bulunmuştur.	*Negi et al., 2001* *Kasyhap et al., 2019*
Islatma, fermantasyon, çimlenme, kabuk ayırma, kaynatma ve kavurma	Bu işleme yöntemlerinin çoğu evde yemek pişirmede sıklıkla kullanılır, ancak sindirilirliği iyileştirmede küçük bir etkisi (~%10) vardır.	*Devi et al., 2018*
Ekstrüzyon	Ekstrüzyon işlemi, incelenen tüm baklagillerde İVPS geliştirmiştir. Baklaların İVPS, 140 °C'de ve %18 nem içeriğinde, ıslatılmamış çiğ tohumlarda %75.4'ten, ıslatılmış ekstrüde tohumlarda %80.4'e yükselmiştir.	*Abd El-Hady and Habiba, 2003*
Mikrodalga işlemi	Acı ve tatlı acı bakla tohumları mikrodalga işleminden önce sırasıyla 96 ve 24 saat ıslatılmıştır. Mikrodalga işlemenin İVPS işlem görmemiş tohumlara kıyasla %2.5 ve %1.5 oranında önemli ölçüde iyileştirdiği bulunmuştur.	*Embaby, 2010*
Ultrases ve yüksek hidrostatik basınç (HHP)	1 saat HHP uygulama ve ardından 98°C'de 30 dakika ısıtma baklagillerin İVPS arttırmıştır. Çiğ baklagillerle karşılaştırıldığında, çözünür protein konsantreleri %2-4 daha yüksek İVPS sergilemiştir.	*Han et al., 2007*

Kullanılan pişirme yöntemi, pişirilmiş mercimeğin amino asit bileşimi üzerinde de etkilidir. Pişirme uygulamaları lizin (mikrodalga pişirme hariç), triptofan ve toplam aromatik ve kükürt içeren amino asitlerin konsantrasyonunu azaltmıştır, ancak lizin, izolösin (otoklavlama hariç) ve toplam aromatik amino asit içeriği yüksek kalmıştır (Hefnawy, 2011). Mikrodalgada pişirmenin, haşlama ve

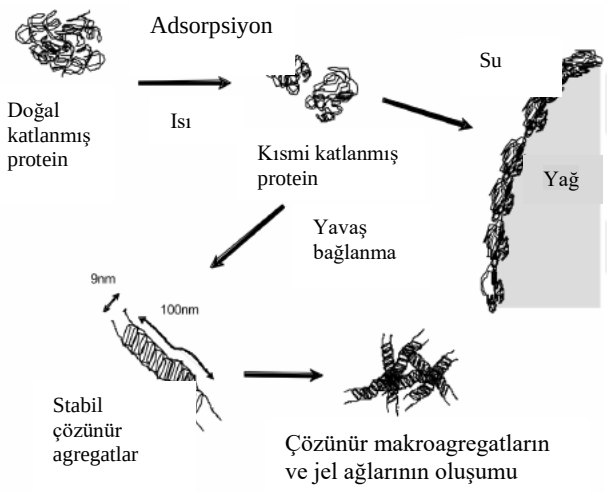
otoklavlamaya kıyasla mercimeğin besleyici değerini koruduğu ve tüm pişirme işlemlerinin *in vitro* protein sindirilirliğini ve protein verimlilik oranını iyileştirdiği ileri sürülmüştür (Samaranayaka, 2017). Mercimek için literatürde rapor edilen protein sindirilirlik değerleri %95.19 (Monsoor and Yusuf, 2002), %81.76-99.88 (Sulieman et al., 2008), %79.1-79.4 (Han, Swanson and Baik, 2007) ve %73.5 (Melito and Tovar, 1995) şeklindedir.

2.2.1. Gıda matrisi

Lipolitik ve proteolitik süreçler, gıda emülsiyonunun doğasına büyük ölçüde bağlıdır ve Gİ sistemde karşılaşılan çevresel ve fizikokimyasal koşullar tarafından önemli ölçüde değiştirilebilmektedir (Bourlieu et al., 2015). Besin öğelerinin sindirilirliğini, biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlılığını belirlemek için ele alınması gereken önemli bir konu da gıda matrisidir. Örneğin protein sindirimi süt ürünü olan peynir matrisinde, bitkisel ürünlerin matrislerine göre farklılık gösterir. Ayrıca gıdanın işlenmesi sırasında gıdanın mikro yapısında ve dolayısıyla gıda matrisinde değişiklik meydana gelir ve bu değişiklik proteinin gıda matrisinden serbest forma geçişini dolayısıyla sindirilirliğini etkileyebilmektedir. Isıl işlem gibi gıda işleme uygulamalarının protein yapılarında açılmaya ve/veya tripsin inhibitörlerinin etkisizleştirilmesine yol açarak protein sinidirilirliğini iyileştirdiği belirtilmiştir (Reynaud et al., 2020).

Sindirim mekanizmasına ilişkin protein izolatları üzerinde yapılan araştırmalar kesin bilgi verse de sonuçlar gerçek gıda matrisi için doğru tahminler vermeyebilir. Reynaud et al., (2020) bitkisel proteinler üzerinde protein sindirimine ısıl işlemin ve gıda matrisi etkisini araştırmışlardır. Isıl işlemin, proteinlerin kısmi denatürasyon ve yapısal dönüşümler nedeni ile sindirilirliği değiştirdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalar; izole proteinlerle kıyaslandığında sıvı gıdalarda bile gıda matrisinin proteinler üzerine etkisi olduğunu göstermiştir (Carbonaro et al., 2015). Proteinlerin kısmen denatüre ve modifiye edilmiş biçimleri meyvelerde ve sebzelerde, sert kabuklu yemişlerde veya haşlanmış (ıslak ısıl işlem) veya kavrulmuş (kuru ısıl işlem) tohumlarda meydana gelebilmektedir. İşlem sırasında gıda proteinlerinde kimyasal modifikasyonlara ek olarak protein açılması ve

kümelenme meydana gelebilmektedir (Şekil 1). Bitki tohumu proteinlerinin pişirme sırasında üçüncül yapıları ve bir dereceye kadar ikincil yapıları değişebilir. Sonuç olarak proteinler büyük makromoleküler agregatlar ve jel ağları oluşturabilir. Protein yapısındaki bu tür değişiklikler, sindirim stabilitesini ve dolayısıyla alerjenlerin hem duyarlılaşma hem de ortaya çıkma açısından bağışıklık sistemine sunulma biçimini etkileme potansiyeline sahiptir. Proteinlerin işleme koşullarından etkilenme derecesi sürece bağlıdır, çünkü protein denatürasyonu suyun varlığını gerektirdiğinden, proteinler düşük su içeren sistemlerde daha termostabil hale gelir. Zaman ve sıcaklık kombinasyonları, yağlar ve şekerler gibi diğer bileşiklerin mevcudiyeti, gıda proteinlerinin denatürasyon ve agregasyon modellerini ve kinetiğini de etkilemektedir (Mills et al., 2009).



Şekil 1 Gıda işleme sırasında proteinlerin yapısında meydana gelen değişiklikler (Mills et al., 2009)

İzole proteinlerin sindirim sırasındaki davranışına/hidrolizine yönelik çalışmalar çok olmakla birlikte (Santos-Hernández et al., 2020) proteinlerin gıda matrisi içerisinde Gİ sindirimi sırasında nasıl bir metabolik süreç izleyeceği öngörülememektedir. Bitkisel proteinler hayvansal proteinlere göre daha büyüktür ve hidrofobik kısımların gömülü olduğu globüler yapıya sahiptirler. Bitkisel protein kaynaklarından baklagiller ve tahıl proteinlerinin hayvansal proteinlerden (örneğin miyoglobin, sığır serum albumin) yapısal olarak en önemli farkı sekonder yapılarında yüksek miktarda β-tabaka konformasyonu ve düşük miktarda α-heliks yapı içermeleridir. β-tabaka konformasyonu Gİ sindirimi sırasındaki denatürasyona direnç gösterir. Ayrıca sistein içeriği yüksek olan bitki proteinleri (örneğin albumin

fraksiyonu) ısısal işlem ile denatürasyona ve pepsin, tripsin ve kimotripsin proteolitik enzimlerine karşı dirençlidir. Stabilite, BBI'lerinde olduğu gibi düşük molekül ağırlık ve fazla sayıda disülfit bağının bulunmasından kaynaklanır. Örneğin soya BBI proteininin molekül ağırlığı 8 kDa' dur ve 7 adet disülfit köprüsü içerir. Oldukça stabil diğer BBI mercimek ve bezelyeden izole edilmiştir. Kurubaklagil lektinleri ise oldukça sıkı β-tabaka yapıları nedeniyle sindirim bölgesindeki asidik koşullara dayanıklıdır. Bir diğer örnek tahıllarda bulunan 30-160 kDa molekül ağırlığına sahip olan ve 50 adet disülfit bağı içeren glutenindir. (Carbonaro et al., 2015). Nguyen et al., (2016), bebek formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan hidrolize ve hidrolize olmayan süt proteinlerinin (kazein ve peynir altı suyu proteinleri) ve soya proteinlerinin sindirimini, sırasıyla mide ve ince bağırsakta *in vitro* Gİ (lipazsız) koşullarda 60 ve 120 dakika boyunca incelemişlerdir. Soya proteini fraksiyonları, sindirim sırasında kısmen hidrolize olmuştur. Mide sindirimi sırasında protein agregat boyutlarında hafif bir azalma oluşmuştur. Bunun nedeni; soya proteinlerinin hidrofobik β-tabaka yapısı ve ısıl işlemin etkisi olarak belirtilmiştir.

2.3. Yaşamın Erken Döneminde Proteinin Önemi ve Bebek Formülasyonları

Yetersiz beslenme veya aşırı beslenme, yaşamın en savunmasız olduğu sütten kesilme döneminde bebeğin anne sütünden normal yemek düzenine geçtiği 6 ila 24 aylık dönemde görülebilmektedir. Bebekler ve küçük çocuklar özellikle yetersiz beslenmeye karşı savunmasızdırlar çünkü, yüksek büyüme hızlarına sahiptirler ve dolayısıyla yüksek enerjiye ihtiyaçları vardır (Siva-Shankar et al., 2018). Yaşamın erken döneminde protein alımı bebeklerde gelişim, büyüme, vücut kompozisyonunun sağlanması, nörogelişim, iştah ve hormonal düzenleyici olarak görev yapmak için çok önemlidir (Michaelsen and Greer, 2014). Proteinlerin yeterli miktarda zorunlu aminoasitleri sağlamaları beslenmede metabolik ihtiyaçları karşılamadaki temel görevidir. Protein gereksinimi, yetişkenlerde vücut ağırlıkları başına günlük 0.8 gram, bebeklerde ise 1.5 gramdır ve dolayısıyla bebeklerde protein gereksinimi yetişkinlere göre daha fazladır (Victora et al., 2016).

Anne sütü bebekler için altın standart olarak kabul edilir ve bebeklerin ilk 6 ay anne sütü ile beslenmesi önemle tavsiye edilir. Ancak bazı durumlarda anne sütü yerine bebek formülasyonları (BF) kullanılmaktadır. BF, anne sütünde bulunan miktara yakın zorunlu aminoasit içermelidir. Geçerli Avrupa Yönetmeliği'ne göre BF (0-6. ay) için izin verilen protein kaynakları inek sütü proteini, keçi sütü proteini, soya proteini izolatı ve hidrolize pirinç proteini olarak belirtilmiştir (EU, 2016). Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri ve Devam Formülleri Tebliği'ne (TEBLİĞ NO: 2019/14) göre bebek formülleri (0-6. ay) ve devam formüllerinde izin verilen protein kaynakları inek sütü proteini, keçi sütü proteini, soya proteini izolatı olarak belirtilmiştir (TDK, 2019).

Bitkisel proteinlerin BF'nda kullanılması ile ilgili baklagil proteinleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. En eski çalışmalardan biri, nohut proteininin bir süt ikamesi olarak Gİ problemleri olan çocuklar için potansiyel bir kaynak olduğu ve Codex Alimentarius Komisyonu standartlarına uygun iyi besin değerleri gösterdiğini belirtmiştir. Benzer şekilde bebek devam formülü/tamamlayıcı gıda (6-12 ay) ile ilgili AB yönetmeliğinin minimum beslenme gereksinimlerini karşıladığını gösteren nohut bazlı formülasyonların beslenme kalitesini tasarlamış, formüle etmiş ve belirtmişlerdir (Ulloa and Garcia, 1988).

Egounlety et al., (2002) taneli baklagilleri (soya fasulyesi, börülce ve yer fasulyesi), yüksek protein/enerjili baklagil takviyeli tamamlayıcı gıdaların üretimi için 28-36 saat boyunca önceden işlemişler (sırasıyla ıslatma, kurutma ve un haline getirme) ve fermente etmişler, sonrasında 60–66 ° C'de 15 saat kurutmuşlar ve un haline getirmişlerdir. Protein ve enerji seviyeleri sırasıyla %15.55, %19.30 ve 17505.0, 18726.4 kJ/kg arasında bulunmuş ve tamamlayıcı gıdalar için önerilen seviyelerden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bitkisel hammaddelerin örneğin tahılların ve baklagillerin birlikte fermantasyonu, gelişmekte olan ülkelerde hane düzeyinde yüksek protein/enerjili, kabul edilebilir ve besleyici değeri yüksek tamamlayıcı gıdaların üretimi için uygun bir teknik olarak görülmektedir.

BF insan sütünü yakından taklit edecek şekilde makro besin öğelerinden (karbonhidratlar, yağlar ve proteinler) ve mikro besin öğelerinden (mineraller ve vitaminler) oluşmaktadır. Gomez-Martin et al., (2019) ürün markası hakkında bilgi

vermeden, her bir gıda kategorisinde ticari BF'nın ortalama enerji ve makro besin öğesi bileşimlerini hesaplamışlardır. 0-6 aylık bebek mamalarının, olgun anne sütüne (10-12 hafta) kıyasla benzer enerji ve makro besin öğesi bileşimine sahip, ancak enerji ve protein bakımından daha düşük ve toplam lipitlerin 1 ila 4 hafta arasında üretilen anne sütündekinden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. 6-12 aylık bebekler için üretilen özel BF'nın bir porsiyonu günde alınması gereken protein ihtiyacını %37.53 düzeyinde karşılarken, baklagil içeren BF %17.27'sini karşılamaktadır. Enerji için bu yüzdenin sırasıyla %19.12 ve %7.43 olduğunu hesaplamışlardır.

Çoğu BF yüksek besin değeri nedeni ile inek sütü ile formüle edilmiştir. Ancak inek sütü proteinine alerjisi olan bebekler için hidrolize protein içeren BF kullanılmaktadır. Bununla birlikte Gİ ve alerjik problemleri olmayan bebekler için de kullanımı artmaktadır. Standart BF'nın, hidrolize protein içeren formüllerden daha geniş çeşitlilikte biyoaktif peptitler açığa çıkardığı belirtilmiştir (Wada and Lönnerdal, 2015). Tartışmalar olsa da bazı çocukların soyaya alerjisi olması veya inek sütü alerjisi olan bazı çocukların da eşlik eden soya alerjisi göstermesi nedeniyle soya formüllerinin kullanımı kısıtlanmıştır (Tzifi et al., 2014).

Bitkisel proteinlerin işleme ve depolama sırasındaki davranışı, formülasyon tozlarının fiziksel stabilitesini sağlamalıdır. Roux et al., (2020) süt proteinlerinin bitki proteinleri ile kısmen ikame edilmesi ile yarı endüstriyel ölçekte üç BF geliştirmişlerdir. Formülasyonun %50'sinde referans olarak peynir altı suyu proteinleri ve kısmi ikame bitkisel protein olarak ise bezelye ve bakla proteinleri kullanılmıştır. Referans formül ile karşılaştırıldığında ikame edilmiş formülasyonlar stabil olmayan emülsiyon sonuçları vermiştir. Bu nedenle kalite kriterlerinin karşılanması için her protein kaynağının BF'na uygunluğu sağlanmalıdır.

Roux et al., (2020) proteinlerin %50 sinin süt referans bebek maması formülasyonu olarak peynir altı suyu proteinleri, bitkisel protein olarak ise bezelye, bakla, pirinç ve patates proteinleri içeren dört farklı BF geliştirmiştir. Formülasyonlar, yenidoğan bebek (28 günlük) sindiriminin simüle edildiği *in vitro* statik sindirimi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlarda bezelye ve bakla içeren

formülasyonlar ile süt referans sonuçlarının protein hidrolizi ve aminoasitlerin biyoerişilebilirliği açısından benzer, ancak pirinç ve patates içeren formülasyonlarda bu değerlerin daha düşük olduğu görülmüştür. BF bileşenlerinin sindirimi üzerinde bir dizi sistematik çalışma yapılması bu bileşiklerin sindirilirliğinin daha iyi anlaşılmasına ve dolayısıyla besin öğelerinin biyoerişilebilirliği hakkında önemli bilgiler vermeye yardımcı olacaktır.

2.4. *İn vitro* Sindirim

Sindirilebilir proteinler çeşitli peptitlere ve aminoasitlere hidrolize edilebilir ve protein bozunma ürünleri fizyolojik olarak önemlidir. Proteinlerin simüle edilmiş fizyolojik koşullar altında sindirilirliği ve yapısal değişikliklerini değerlendirmek için *in vitro* sindirim protokolleri oldukça yararlıdır. Gİ sindirim, gıdanın organizma tarafından kullanılarak besin öğelerini açığa çıkarmak için farklı enzimlerin etkisi ile parçalanmasını içeren fiziksel ve kimyasal bir süreçtir. *İn vitro* modeller, *in vivo* modellere kıyasla standartlaştırılmış koşullar altında kolay örnekleme ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlar, ayrıca hızlı ve ucuzdur. Etik sakıncaları da yoktur. Cost Action INFOGEST kapsamında 35'ten fazla ülkedeki bilim adamları tarafından insan fizyolojik koşullarına uyumlu bir *in vitro* sindirim protokolü önerilmiştir (Minekus et al., 2014; Bohn et al., 2018). Sindirim modelleri statik (Dupont et al., 2010), yarı dinamik (Amara et al., 2014; Bourlieu et al., 2015) veya dinamik (Blanquet et al., 2004; de Oliveira et al., 2016) olabilmektedir.

İn vitro statik bir modelle yetişkin durumundaki sindirimi taklit etmek için uluslararası bir uzlaşma bulunmaktadır (Minekus et al., 2014). Ayrıca, birçok inceleme, bebek sindirim sisteminin yetişkinlere kıyasla olgunlaşmamış olduğunun altını çizerek, bebek sindirim koşulları hakkında mevcut olan fizyolojik verileri sunmuştur (Abrahamse et al., 2012; Bourlieu et al., 2014). Bu farklılıklar hem enzimatik (enzimlerin tipi ve aktivite seviyesi) hem de enzimatik olmayan (süt bazlı diyet, beslenme sıklığı, safra tuzu konsantrasyonları) parametrelerle ilgili bulunmuştur. Erken bebeklik döneminin beslenme açısından önemi artık yaygın olarak kabul edilmektedir. BF'nı optimize etmek için yeterli *in vitro* sindirim araçlarının kullanılması bir önceliktir. *İn vitro* bebek sindiriminin sonuçlarını sunan

son yayınların sayısı, yakın zamanda gözden geçirildiği gibi bu araca olan ilginin iyi bir örneğidir (Shani-Levi et al., 2017).

Statik modellere odaklanan yakın tarihli bir inceleme, bebek sindirimini taklit etmek için kullanılan parametrelerdeki değişkenliği vurgulamıştır (Shani-Levi et al., 2017). Bu nedenle, zamanında doğan yeni doğan bebeklerin *in vivo* sindirim parametrelerine dayanan ayrıntılı bir *in vitro* sindirim modeline ihtiyaç duyulmuştur. Bu bağlamda, yeni doğan bebekler (28 günlük yaşam, gebelik yaşı 38-42 hafta) için *in vivo* statik sindirim modelinin *in vitro* statik sindirim modeli önerilmiştir (Menard et al., 2018). Bu modele göre bebek mamasının sıvı olduğu ve ağızda kalma süresinin kısa olduğu varsayılmıştır. Bu sindirim protokolüne göre mide ve ince bağırsak aşaması aşağıdaki gibi açıklanmıştır (Torcello-Gomez et al., 2020).

Mide aşamasında bebeklerin mide koşullarının parametreleri (yemek/salgıların oranı, pH), midenin boşalma süresinin yarılandığı durumdaki koşullar olarak belirlenmiştir. Bourlieu et al., (2015), bebek maması için 78 dakikalık bir mide boşalma yarı süresini rapor etmiştir. Yemek alımının başlamasından 78 dakika sonra, yemeğin salgılara oranı (v/v) 63/37 olarak belirlenmiştir. Bebeklerde mide pH'ını ölçen verilerin derlenmesi, mide asitleşme eğrisini tanımlayan lineer bir regresyonun belirlenmesine olanak vermiştir (pH = -0.015∗ zaman (dk.) + 6.52). Daha önce de belirtildiği gibi 78 dakikalık mide boşalma yarı süresi göz önüne alındığında, statik modelde mide pH'sı 5.3 olarak belirlenmiştir (Bourlieu et al., 2015). Bebek mide aspiratlarında belirlenen tokluk enzim aktivitelerine dayanarak, mide içeriğinin ml'si ve bebeğin vücut ağırlığının kg'ı başına 63 U pepsin ve 4.5 U lipaz ortalama değerleri (Armand et al., 1996; Roman et al., 2007) bulunmuştur. Böylece, 4.25 kg'lık bir aylık bir bebeğin ortalama vücut ağırlığı göz önüne alındığında (de Oliveira et al., 2016), enzim aktiviteleri pepsin ve lipaz için 268 U/ml mide içeriği ve 19 U/ml mide içeriği olarak belirlenmiştir. Simüle edilmiş mide sıvısı (SGF), sırasıyla 94 ve 13 mM sodyum klorür ve potasyum klorürden oluşmakta ve mide ortam pH'sı 1 M HC1 ile pH 5.3'e ayarlanmaktadır. 60 dakikalık mide sindiriminden sonra, pH, 1 M NaOH ile 6.6'ya ayarlanmakta ve ince bağırsak sindiriminden önce midedeki enzim aktivitesi durdurulmaktadır.

İnce bağırsak aşamasında 60 dakikalık mide sindirimi aşamasından sonra, 1 M NaOH kullanılarak ortam pH'ı 6.6'ya ayarlanmaktadır. Bağırsak fazı için yemek/salgılar oranı, genel ortalama salgı akışının olduğu dinamik sindirim model DIDGI®'da salgı akışlarının (safra, pankreatin ve sodyum bikarbonat) simülasyonu kullanılarak sindirimin 78. dakikasında belirlenmiştir. Böylece, sindirimin 78. dakikasında, bağırsak fazı için öğünün toplam salgıya (mide ve bağırsak) oranı (v/v) 39/61 olarak belirlenmiştir. 1 haftalık, zamanında doğan bebeklerin duodenal sıvısının karakterizasyonuna dayanan simüle edilmiş bağırsak sıvısı (SIF), 164 mM sodyum klorür, 10 mM potasyum klorür ve 85 mM sodyum bikarbonattan oluşmaktadır ve pH 7' olarak belirlenmiştir. Kalsiyum klorür, bağırsak sıvısının hacmi içinde 3 mM'lik bir konsantrasyonda bağırsak fazının başlangıcından önce ayrı olarak ilave edilmektedir. Sığır safra özütü, 2 haftalık sekiz bebeğin duodenal aspiratlarında belirlenen ortalama tokluk değerine karşılık gelen 3.1 mM safra tuzu nihai içeriği olacak şekilde eklenmektedir. Eklenen pankreatin miktarı, daha önce incelenen *in vivo* verilerle tutarlı olan 16 U/mL olarak belirtilmiştir.

Proteinlerin Gİ sistemdeki akıbetinin değerlendirilmesi, alerjik reaksiyona neden olma potansiyelleri de dahil olmak üzere tüketilmelerinin güvenli olup olmadığını değerlendirmek için de çok önemlidir. Proteinlerin sindirime direnci, alerjen potansiyellerinin belirlenmesiyle ilgili olarak önemli olabilir, çünkü tamamlanmamış sindirim, on iki parmak bağırsağında duyarlılaşma ve/veya ortaya çıkma yoluyla istenmeyen bağışıklık tepkilerine neden olabilmektedir. Bu nedenle, bir dizi değerlendirmenin ve *in vitro* protokollerin bir parçası olarak proteinlerin sindirilirliğini değerlendirmek, etik kısıtlamalar *in vivo* çalışmaları engellediğinde uygun görünmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) yönergeleri ve (AB) 503/2013 Sayılı Uygulama Tüzüğü (IR503/2013) doğrultusunda bu amaçla en yaygın olarak kullanılan *in vitro* sindirim modeli, pepsine direnç testidir. Bu, gıdanın tüketildikten hemen sonra maruz kaldığı normal fizyolojik ortamı temsil etmeyen parametrelerle sindirimin mide fazını taklit etmektedir. Yani, yüksek asidik olan mide koşullarını ve insan erişkinlerinde mide boşalmasının sonunu (geç faz) veya açlık durumunu simüle edecek enzim konsantrasyonu kullanılmaktadır (Thomas et al., 2004).

Torcello Gomez et al., (2020) ‘e göre geç faz yetişkin statik *in vitro* sindirim protokolü, pepsin direnci test protokolündeki olduğu gibi bir mide fazını ve ardından yukarıdaki yetişkin modelinin bağırsak fazını içermektedir. Kısaca, mide fazında, 0.5 mL izole protein (5 mg/mL) veya 0.5 g yemek, protein solüsyonu veya öğününün SGF'ye 5:95 (h/h) oranında geç faz yetişkin SGF eklenmekte ve pH 1.2'ye ayarlanmaktadır. Tüm örnekler için pepsin aktivitesi, yemeklerin mide fazı için son hacimde 2500 U/mL'ye eşdeğer olan 10 U/µg test izole proteinine göre belirlenmektedir.

Sağlıklı yetişkinlerde veya bebeklerde mide ve sonraki ince bağırsak aşamasını ve diğer ilgili koşulları içeren daha gerçekçi bir yaklaşım, pH ve enzim konsantrasyonunun birleşik etkisinin protein sindirilirliğini nasıl etkilediği hakkında faydalı bilgiler sağlayabilir. Bu nedenle, EFSA Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) paneli tarafından sunulan kılavuza uygun olarak bu tez çalışması, erken faz (veya tokluk durumu) ve geç faz (veya açlık durumu) yetişkin ve bebek Gİ ortamlarını taklit eden, fizyolojik olarak daha alakalı bir dizi durumu ele almaktadır.

Eşzamanlı veya sıralı sindirim yoluyla proteazlarla bireysel veya kombine işlemlerin, proteini çeşitli kaynaklardan değişen derecelerde hidrolize ettiği gösterilmiştir. Endopeptidazlar (tripsin, kimotripsin, pepsin, pankreatin, asit proteaz, aktinidin, bromelain, papain, Alcalase™), proteinlerdeki veya terminal ucu olmayan amino asitteki (N-/C-terminalinden uzakta hareket etme eğiliminde olan) peptit bağlarını hidrolize edebilirler. Ekzopeptidaz aktivitesi için serbest bir N-terminal amino grubu veya bir C-terminal karboksil grubu veya her ikisi gereklidir. Pepsin, optimum pH değerine sahip bir karboksil proteazdır ve aktif merkezinde bir aspartik asit kalıntısına sahiptir. Tripsin, iyi tanımlanmış bir özgüllüğe sahiptir, birincil bağlanma (P1) pozisyonunda lizin ve arginin arasındaki peptit bağını parçalar. Öte yandan kimotripsin, belirli amino asitlerin (lösin, tirozin, fenilalanin ve triptofan ve daha düşük oranda glutamin, serin ve treonin) yanında parçalayan spesifik olmayan bir proteaz olarak tanımlanmıştır (Barrett et al., 2004). Pankreatin, amilaz ve lipaza ek olarak tripsin benzeri ve kimotripsin benzeri proteazlar içeren enzimlerin bir karışımıdır. Protein sindirilirliğini ve protein hidrolizi sırasında parçalanan toplam peptit bağlarının sayısını ölçmek için çeşitli yöntemler tarif

edilmiştir. Hidroliz (DH) veya protein sindirilirlik derecesi, pH düşüşü, trinitrobenzensülfonik asit (TNBS), o-ftaldialdehit (OPA), pH stat ve sulu trikloroasetik asitte (SN-TCA) çözünür azotu belirleme gibi geniş çeşitlilik gösteren yöntemler kullanılmaktadır (Hsu et al., 1977; Nielsen et al., 2001; Potier and Tome, 2008).

Günlük beslenmede hem çevresel hem de sürdürülebilirlik kaygıları nedeniyle protein kaynağı olarak bitkisel proteinlere olan ilgi artışı, bu proteinlerin sindirim sürecini daha iyi anlamayı gerektirmektedir. Ancak, bitkisel proteinlerin diyette daha çok yer alması, hayvansal proteinlere kıyasla genel olarak daha düşük sindirilirlik nedeniyle gereksinimi karşılamakta yeterli olmamaktadır. Ayrıca gıda matrisi ve uygulanan gıda işlemleri de protein sindirilirliğini etkilemektedir. Gıda matrisi ve gıda işleme (ısıl işlem veya termal olmayan işlemler), proteinin agregasyonunu, proteinlerin diğer proteinler ve protein olmayan bileşikler ile etkileşimini, proteaz inhibitörlerinin inhibisyonu ve/veya etkisini, proteazların proteine erişilebilirliğini etkilemektedir. Bu nedenle tez çalışmasının amacı, farklı Gİ senaryolarında (bebek ve yetişkinlerde açlık ve tokluk durumundaki sindirim koşulları) Türk halkının diyetinde genellikle yer alan bitkisel protein kaynaklarından biri olan mercimek proteinlerinin *in vitro* koşullarda sindirilirliği/hidrolizini araştırmaktır. Ayrıca bu GI koşullarında gıda matrisinin ve gıda işlemenin etkisi, izole proteinler ile gıda matrisindeki proteinlerin sindirilirliği/hidrolizi ve ısıl işlem uygulanmamış mercimek proteinleri ile ısıl işlem uygulanmış proteinlerin sindirilirliği/hidrolizi karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ek olarak 3 farklı *in vitro* sindirim ortamında protein izolatı, un formu ve pişmiş formdaki mercimeğin ince bağırsak sindirimi sonrasında açığa çıkan molekül ağırlığı 5 kDa'dan küçük olan peptit dizilimleri kıyaslanmış ve BİOPEP-UWM veri tabanı kullanılarak biyoaktiviteleri karşılaştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hammadde

Tez çalışmasında kullanılan yeşil mercimek *(lens culinaris)* İzmir'de bulunan yerel bir marketten satın alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Analizlerde kullanılan sodyum klorür (106404), sodyum hidroksit (106462), potasyum klorür (104936), Coomassie blue G 259 (C.I 42655), dipotasyumhidrojen fosfat (A567300), sodyum dodesil sülfat (436143), sodyum tetraborat dekahidrat (S9640), o-fitaleldahit (P0532), ditoreitol (DRR-RO), serin (S4503) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Etanol (34870), potasyum fosfat monobazik (60221), Tris (Cat.: 25.285-9); pepsin (P7012), pankreatin (P7545), safra tuzu (B8631), pefabloc® (76307), sodyum bikarbonat (S8875), kalsiyum klorür (C4901), hidroklorik asit (07102), Bikinkoninik asit kiti (BCA1), bovine serum albümin (liyofilize, A2153), Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Ultrafilitrasyon tüpleri Vivaspin 15R model MWCO 5000 ve ultrafiltrasyon membranları Sartorius Stedim Biotech GmbH'den alınmıştır.

Kullanılan diğer tüm kimyasal malzemeler Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiş olan analitik saflıktaki kimyasal malzemelerdir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Blender: Analizler sırasında mercimeği un hale getirmek için Robot Cupe marka blender kullanılmıştır.

Çalkalamalı İnkübatör: Tüm örneklerin ağız, mide ve ince bağırsak sindirim aşamalarında Stuart. S1500 (OSA. Birleşik Krallık) çalkalamalı inkübatörü kullanılmıştır.

Çoklu Mikro Plaka Okuyucu: Örneklerin BCA ve OPA analizleri için Thermo Fisher Scientific, Varioskan Flash (Almanya) marka çoklu mikro plaka okuyucu kullanılmıştır.

Derin Dondurucu: Örneklerin ve kimyasalların saklanması amacıyla Regal marka buzdolabı kullanılmıştır.

Elektroforez Cihazı: Pişmiş mercimek, mercimek unu, protein izolatı ve *in vitro* mide ve bağırsak sindirimi sonrası örneklerin protein profillerinin belirlenmesinde Bio-Rad mini-protean tetra cell (Çin) ve İnvitrogen elektroforez sistemi kullanılmıştır.

Hassas Terazi: Gram düzeyindeki tüm tartım işlemlerinde Denver Instrument, SI 234 terazi kullanılmıştır.

Hassas Terazi: Enzimlerin tartımı ve mg düzeyinde yapılan tüm tartım işlemleri için Mettler Toledo marka hassas terazi kullanılmıştır.

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı: Analizlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve homojen karıştırma sağlanması için IKA. RH basic 2 (Almanya) kullanılmıştır.

Kjeldahl Cihazları: Örneklerin protein tayinini yapmak için yakma işleminde Gerhardt Kjeldatherm ve distilasyon işleminde de Gerhardt distilasyon ünitesi kullanılmıştır.

Karıştırmalı ısıtıcı: SDS-Page analizi öncesi örnek hazırlama aşamasında ve pepsin aktivitesini belirlerken enzimleri inkübe etmek amacıyla Eppendorf ThermoMixer C (Almanya) kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı: Çözelti hazırlama işlemlerinde IKA. Big Squid (Almanya) manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

pH metre: Sindirim sıvılarının ve çözeltilerin pH ayarlamalarında WTW inoLab® pH 7110 (Almanya) kullanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj: *İn vitro* sindirim ve ultrafiltrasyon işlemlerinde Nüve NF 800R (Türkiye) kullanılmıştır.

Vorteks Karıştırıcı: Analizler sırasında homojen bir karışım sağlamak için Isolab Laborgerate GmbH kullanılmıştır.

Otoklav: Mercimeğin pişirilmesi için Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında bulunan otoklav cihazı kullanılmıştır

3.2.2. Mercimek protein izolatı eldesi

Sulu alkali ekstraksiyonu (pH 8-11) ve ardından izoelektrik çöktürme (pH 4-5), mevcut ana proteinlerin doğası gereği baklagil proteinlerinin ekstraksiyonu için kullanılan en yaygın sulu işleme tekniğidir. Mercimek protein izolatı Akıllıoğlu ve Karakaya, (2009) ve Hernandez et al., (2020)'a göre elde edilmiştir. Özetle, mercimek blender kullanılarak un haline getirilmiş ve ilk olarak alkali koşullarda (pH 8.0-9.0) proteinler ekstrakte edilmiştir. Un haline getirilmiş mercimeğe distile su eklenerek (mercimek:su; 1:3, w/v), pH 1 M NaOH ile 9'a ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 1 sa manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak proteinlerin çözünmesi sağlanmıştır ve sonrasında 7500 g'de +4°C'de 20 dk. santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım alınmış ve pH 1 M HCl ile 4.5'e ayarlanarak proteinler çöktürülmüştür. Çökelti birkaç kez distile su ile yıkanarak nötralize edilmiştir. Elde edilen izolatın protein içeriği BCA yöntemi ile belirlenmiştir. İzolat, *in vitro* sindirim (3 farklı Gİ koşulunda) ve SDS-Page analizinde kullanılmıştır.

3.2.3. Pişirme işlemi

Mercimek distile su (1:3, w/v) eklendikten sonra 121 °C'de 20 dk. otoklavlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra *in vitro* sindirim uygulanmıştır.

3.2.4. Çalışma planı

Tez çalışmasında kullanılan çalışma planı Şekil 2'de verilmiştir.

3.3. Analizler

Tüm analizler 2 tekrar 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Kjeldahl yöntemi ile protein tayini

Mercimeğin protein miktarı Kjeldahl yöntemine (method 990.03; AOAC, 2006) göre belirlenmiştir. Protein miktarı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

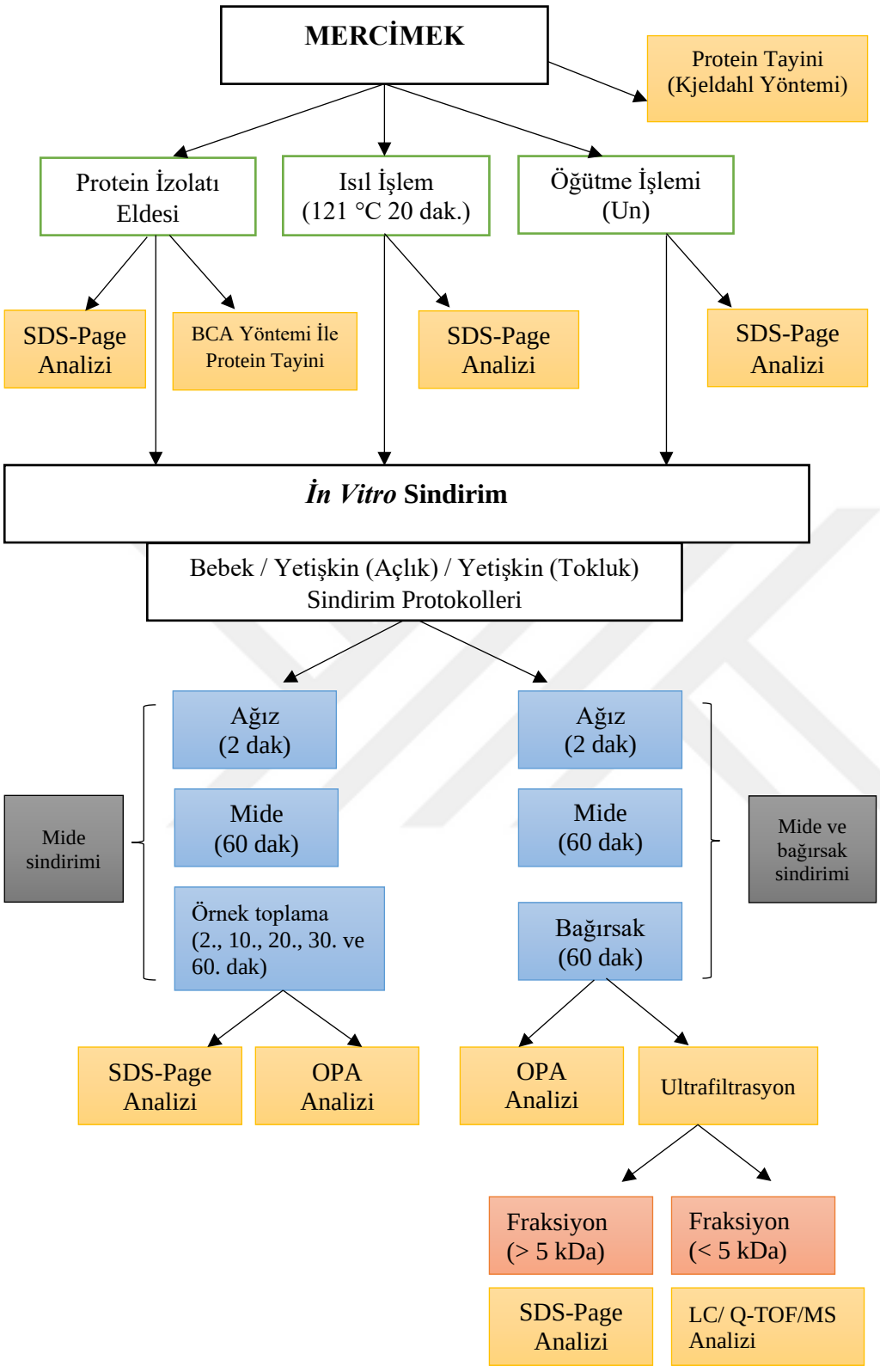
$$\%\ \textbf{Toplam azot} = \frac{(S\text{örnek} - S\text{kör}) * F * 0.0014 * 100}{m} \quad \textbf{(1)}$$

$S_{örnek}$=HCl sarfiyatı, (mL)

$S_{kör}$= HCl sarfiyatı, (mL)

F:HCl çözeltisi faktörü

m=örnek, (g)



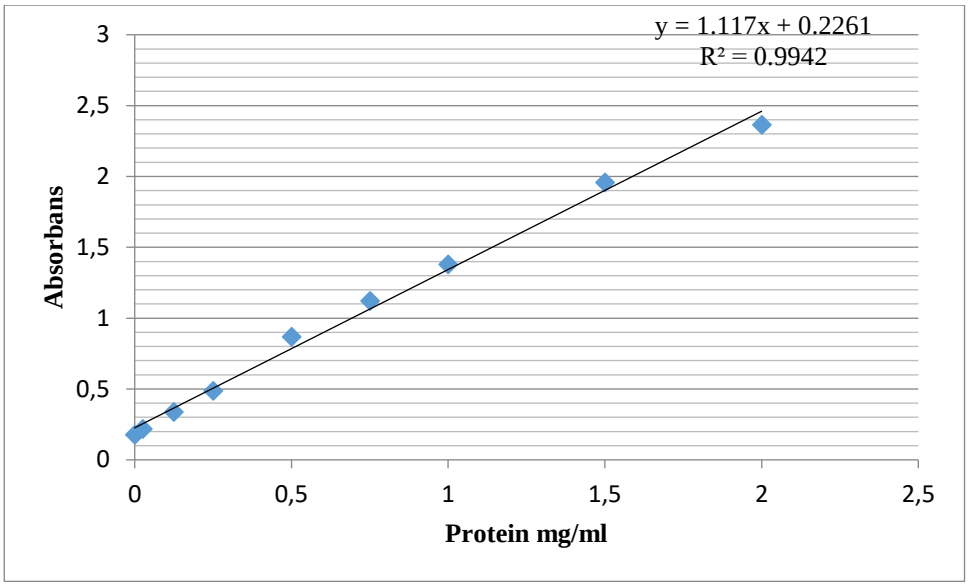
Şekil 2 Çalışma planı

3.3.2. Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile protein tayini

Protein izolatında, SDS-Page analizine ve LC/Q-TOF/MS analizine alınacak sindirilmiş örneklerde protein tayini BCA yöntemi ile yapılmıştır. Analiz Stoscheck (1990)'a göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem diğer protein tayin yöntemlerine göre daha yeni bir yöntemdir ve bakır içeren reaktifin protein ile indirgenmesi ve ortamdaki BCA ile reaksiyonu sonrası 562 nm'de absorbans veren mor rengin ölçümü esasına dayanmaktadır. Yöntemin duyarlılığı 20-100 µg/mL'dir. Kısaca, 25 µL örnek üzerine 200 µL BCA reaktifi BCA1 (Sigma Aldrich) (50:1 v/v; BCA çözeltisi: $Cu_2(SO_4)$ eklendikten sonra 37 °C'de 30 dk. bekletilerek 562 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Sığır serum albumini standart olarak kullanılmıştır. Protein miktarı ($y=1.117x + 0.2261$) denklemi ile hesaplanmıştır (Şekil 3).

Sığır Serum Albumini (BSA) stok çözeltisinin hazırlanması: 50 mg BSA (liyofilize toz. ≥ %98 albumin. Sigma-Aldrich: A-7906) tartılarak 50 mL'lik balon jojede ultra saf su ile tamamlanmış ve 2 mg/mL'lik çözelti hazırlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması: Deney tüplerine sırayla 100 µL saf su/10 µL stok, 20 µL stok, 40 µL stok, 60 µL stok, 80 µL stok ve 100 µL stok konulmuş ve tüpler saf suyla 100 µL' ye tamamlanmıştır. Bu konsantrasyonlardan 25'er µL mikroplaka kuyucuklarına yerleştirilmiştir ve her tüpün üzerine 200 µL BCA reaktifi ilave edilerek hafifçe çalkalanmıştır. Rengin pembe-mor tonda olması beklenmektedir. Cam mikroplaka kullanılarak 562 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri standart eğri grafiğinden (Şekil 3) elde edilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3 BCA standart grafiği

Burada x değerleri mg/mL protein ve y değerleri A562'a karşılık gelmektedir. Bu eğri eşitliğinde okunan absorbansın eşitlikte y yerine konması ile protein miktarı hesaplanmıştır.

3.3.3. Hidroliz derecesinin saptanması (OPA analizi)

Yöntem OPA reaktifinin primer amino grupları ile Ditiotreitol (DTT) varlığında oluşturduğu bileşiğin 340 nm'de ışığı absorblaması temeline dayanmaktadır. OPA reaktifi Nielsen et al., (2001) önerdiği şekilde hazırlanmıştır. 7.62 g di-sodyum tetraborat dekahidrat ve 200 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) 150 mL ultra saf su ile çözündürülmüştür. 160 mg %97 o-fitaleldahit (OPA) 4 mL etanolde çözülmüş ve iki çözelti birleştirilmiştir. 176 mg %99 ditiotreitol ilave edilerek çözelti 200 mL'ye tamamlanmıştır. Mikroplaka kuyucuklarına konulan 150 µL reaktif üzerine *in vitro* sindirim süresince belirli zaman aralıklarında alınan 20 µL örnek eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 340 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Standart olarak serin kullanılmış ve hidroliz derecesinin hesaplanmasında 2 nolu denklemden faydalanılmıştır (Nielsen et al., 2001).

$DH = h / h_{tot} x100$ **(2)**

$h=(serin\text{-}NH_2\text{-}ß) / \alpha\ m_{eqv}/g$ protein,

Serin-NH_2=$OD_{örnek}$-$OD_{kör}$/$OD_{standart}$-$OD_{kör}$x0.9516m_{eqv}/L*0.02*100/X*P

OD=Optik yoğunluk (340 nm'de okunan absorbans),

Serin-NH_2=m_{eqv}serinNH_2/gprotein,

0.9516 m_{eqv}/L =Serin konsantrasyonu,

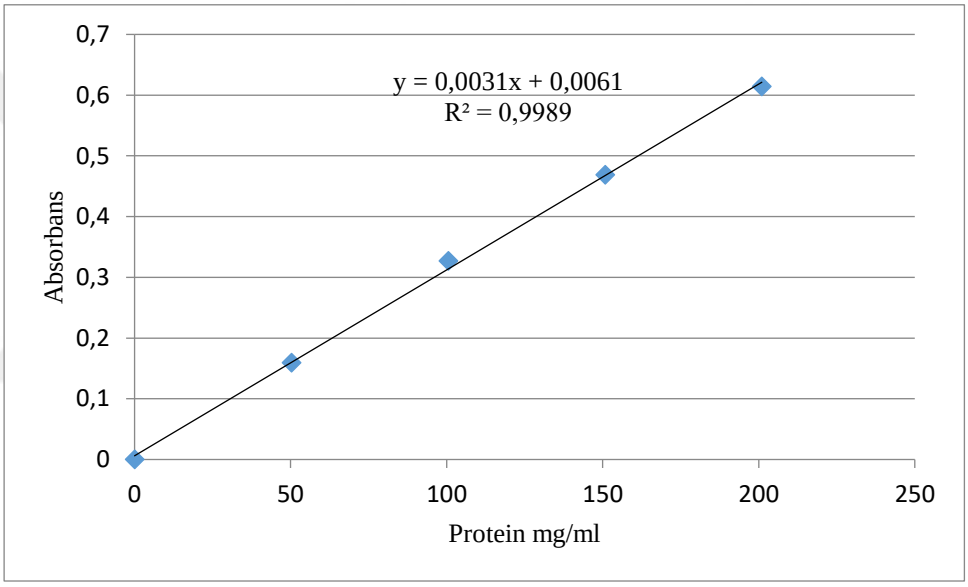
0.02=Örnek hacmi (L),

X=Örnek miktarı (g),

P=Örnekteki % protein

h= hidrolizlenmiş bağların sayısı,

h_{tot}=Protein miktarına eşdeğer toplam peptit bağı sayısı.



Şekil 4 OPA standart grafiği

3.3.4. *İn vitro* sindirim

İn vitro sindirim Brodkorb et al., (2019)'a metodunda bazı değişikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde deneysel koşullar her fazda sabittir ve standart laboratuvar ekipmanları kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Tüm *in vitro* sindirim protokolleri, mide ve ince bağırsak sindirimini içermektedir. Mercimek örneklerine mide sindiriminden önce 2 dk. ağız sindirimi uygulanmıştır. Mercimeğin ağız sindirimi için, tükürük α-amilazı, mide sindiriminde ise domuz kaynaklı pepsin enzimi kullanılmıştır. İnce bağırsak sindiriminde, protein izolatı için yağ ve karbonhidrat içermemeleri nedeniyle tripsin ve kimotripsin enzimleri,

gıdalar için ise domuz pankreasından elde edilen pankreatin kullanılmıştır ve eklenen miktar, bağırsak içeriğinin son hacminde gerekli tripsin aktivitesine göre belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri Brodkorb et al., (2019) 'a göre saptanmıştır. İzole proteinler için eş molar oranda safra tuzları (%97) sodyum glikokolat (NaGC) ve sodyum glikokenodeoksikolat (NaGCDC) kullanılırken, gıdalar için domuzdan elde edilen safra tuzu kullanılmıştır. Tüm *in vitro* sindirim deneyleri, 37 °C ve 100 rpm'de çalkalayıcı bir inkübatörde yatay olarak monte edilmiş 50 mL konik santrifüj tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Protein izolatı/gıdanın *in vitro* sindirimi, her protokol için iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Her bir *in vitro* sindirim protokolü için kontrol deneyleri, gıdanın başlangıç miktarı/protein izolatı miktarı yerine ultra saf su konularak gerçekleştirilmiştir.

Tüm sindirim modellerinde mide sindirimi aşamasından, OPA analizi (protein hidrolizi) ve SDS-Page analizi (protein profili) için belirli aralıklarla örnek alınmıştır. Mide sindiriminin 2, 10, 20, 30 ve 60. dakikalarında 1,5 mL örnek toplanmıştır. Proteaz aktivitesi pH 7'ye getirilerek durdurulmuştur. Tüm numuneler sonraki analize kadar -20° C'de saklanmıştır.

Sindirim sisteminin simüle edilebilmesi için uygulanan yöntemin detaylı açıklaması aşağıda verilmiştir. Bu işlemde simule ağız sıvısı (SSF), simule mide sıvısı (SGF) ve simule ince bağırsak sıvısı (SIF) kullanılmıştır. Sindirim sıvılarının pH'larının ayarlanması için 0.01, 1 ve 6 M HCl ile 0.01, 1 ve 2 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Sindirim işleminden hemen önce enzim aktivasyonlarını sağlamak amacıyla 0.3 mol/L $CaCl_2(H_2O)_2$ tüpteki sindirim sıvılarına ardından eklenmiştir. Analizde kullanılacak pepsin, tripsin kimotripsin ve panktreatin enzimlerinin aktiviteleri Brodkorb et al., (2019)'a göre tespit edildikten sonra gerekli miktarlar hesaplanmıştır. Ultra saf su, simüle edilmiş tükürük (SSF), mide (SGF) ve ince bağırsak sıvılarının (SIF) hazırlanmasında kullanılmıştır. Ağız-mide sindirimi ve ağız-mide-ince bağırsak sindirimi için sindirimler ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.1. Gıdaya uygulanacak ağız sindirimi

Gıdaya uygulanacak tüm Gİ sindirim modellerinde INFOGEST protokolüne göre (Minekus et al., 2014) ağız aşaması uygulanmıştır. Pişirme işlemi uygulanmış

mercimek çiğneme ile elde edilene benzer başlangıç parçacık boyutunu (~ 3 mm) sağlamak için INFOGEST protokolünde önerilen kıyma makinesi ile öğütülmüştür. Mercimek proteini izolatı için ağız aşaması karbonhidrat içermemesi nedeniyle uygulanmamıştır. Her protokol için kullanılan öğütülmüş gıdanın başlangıç miktarı (bebek koşullarında ve tokluk durumunda yetişkinler için 5 g ve açlık durumunda yetişkinler için 0.5 g), SSF'ye 50:50 (w/v) oranında (Tablo 3) eklenmiştir ve pH 7'ye ayarlanmıştır. Ağız bolusu daha sonra her protokolün mide sindirimine tabi tutulmuştur.

3.3.4.2. Bebek sindirim modeli

Bebek statik *in vitro* sindirim protokolü Torcello-Gómez et al., (2020)'e göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, mide fazında, 5 mL protein izolatı (5 mg/mL) veya 10 g oral bolus, 63:37 (v/v) oranında SGF ile karıştırılarak pH, 5.3'e ayarlanmıştır. Mide sindiriminden sonra, pH, 1 M NaOH ile 7'ye yükseltilmiştir. İnce bağırsak fazında, mide kimüsü, 62:38 (v/v) oranında SIF ile karıştırılmıştır ve 1 M HCl ile pH 6.6'ya ayarlanmıştır (Tablo 3). İnce bağırsak sindirim protokolündeki (Brodkorb et al., 2019) diğer koşullar (enzim aktivite tayinleri, enzimler, sindirimin durdurulması) (Tablo 3) aynen uygulanmıştır.

Bebek sindirimi koşullarında ağız sindirimi: Ağızdaki mekanik sindirimi modellemek için blenderdan geçirilmiş olan pişmiş mercimekten 2.5 g, mercimek ununda 2.5 g alınmış, 2.5 mL ultra saf su eklenmiştir. Örnek üzerine 4 mL SSF, 0.025 mL 0.3 M $CaCl_2$ ilave edilmiş ve ultra saf su ile hacim 9.5 mL'ye tamamlandıktan sonra 0.5 ml α-amilaz çözeltisi (75 U/mL) ilave edilmiştir. Tüpler 100 rpm'de, 37 °C'de 2 dk. boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Böylece sindirimin ağız aşaması tamamlanmıştır.

Bebek sindirimi koşullarında mide sindirimi: Ağız sindiriminden alınan içeriğe 4.698 mL SGF eklenmiştir. Pepsinin çalışabilmesi için ortamın asitliği 1 M HCl ile pH 5.3'e ayarlanmıştır. pH ayarlamalarında harcanan çözelti miktarları kaydedilmiş ve hacim ayarlamalarında eklenecek saf su miktarından çıkarılmıştır. Son hacimde ortamda 268 U/mL pepsin içerecek şekilde 1 mL pepsin ilave edilmiş ve tüp içeriği ultra saf su ile 15.873 mL'ye tamamlanmıştır. Tüpler 100 rpm. 37

°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mide sindirimi boyunca mide içeriğinden 2, 10, 20, 30 ve 60. dakikalarda 1 mL örnek alınmış ve pH'ı 2 M NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak pepsin aktivitesi durdurulmuştur.

Bebek durumunda ince bağırsak sindirimi: İnkübatörden alınan mide içeriğine 5.35 mL SIF, 1.216 mL safra çözeltisi eklenmiş ve 2 M NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlanmıştır. 2.432 mL pankreatin (16 U/mL) ve 256 µL $CaCl_2$ eklendikten sonra son hacim 25.602 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanmıştır. 100 rpm'de, 37 °C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden çıkan tüpler buz banyosuna alınarak hızlıca soğutulmuştur. Hızlı bir şekilde 8000g'de 4 ºC'de 20 dakika santrifüj işlemine alınarak faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi mL başına 50 µL 0.1 M Pefabloc (enzim inhibitörü) eklenerek durdurulmuştur. Süpernatant alınarak LC/Q-TOF/MS ve SDS-Page analizi için molekül ağırlık sınır değeri 5000 Da olan ultrafiltrasyon membrandan geçirilmiş ve MA>5000 Da olan fraksiyon SDS-Page analizi için, MA<5000 Da olan fraksiyon ise LC/Q-TOF/MS analizi için -20 ºC'de saklanmıştır.

3.3.4.3. Tokluk durumunda yetişkin sindirim modeli

Erken evre (tokluk) yetişkin statik *in vitro* sindirim protokolü, INFOGEST Minekus et al., (2014) ve Torcello-Gómez et al., (2020) tarafından önerilen yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi protein izolatına mide ve ince bağırsak sindirimi (60 dk.) uygulanmıştır. Tokluk durumunda yetişkin sindirim modeli mercimek ve mercimek unu için ağız sindirim, mide sindirimi ve ince bağırsak sindirimi aşamalarından, Mide sindiriminde, 5 mL protein izolatına (5 mg/mL) veya 10 g oral bolusa, 50:50 (v/v) oranında SGF (Tablo 3) eklenmiş ve pH 3'e ayarlanmıştır. İnce bağırsak fazında mide kimüsüne, 50:50 (v/v) oranında SIF (Tablo 3) eklenerek 1 M NaOH ile pH 7'ye ayarlanmıştır. İnce bağırsak sindirim protokolündeki (Brodkorb et al., 2019) diğer koşullar (enzim aktivite tayinleri, enzimler, sindirimin durdurulması) (Tablo 3) aynı şekilde uygulanmıştır.

Ağız sindirimi: Ağızdaki mekanik sindirimi modellemek için blenderdan geçirilmiş olan pişmiş mercimekten 2.5 g, mercimek unundan 2.5 g alınmış, 2.5 mL ultra saf su eklenmiştir. Örnek üzerine 4 mL SSF, 0.025 mL 0.3 M $CaCl_2$ ilave

edilmiş ve ultra saf su ile hacim 9.5 mL'ye tamamlandıktan sonra 0.5 ml α-amilaz çözeltisi (75 U/mL) ilave edilmiştir. Tüpler 100 rpm'de, 37 °C'de 2 dk. boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Böylece sindirimin ağız aşaması tamamlanmıştır.

Mide sindirimi: Ağız sindiriminden alınan içeriğe 8 mL SGF ve 0.005 mL $CaCl_2$ eklenmiştir. Pepsinin çalışabilmesi için ortamın asitliği 6 M HCl ile pH 3'e ayarlanmıştır. pH ayarlamalarında harcanan çözelti miktarları kaydedilmiş ve hacim ayarlamalarında eklenecek saf su miktarından çıkarılmıştır. Son hacimde ortamda 2000 U/mL pepsin içerecek şekilde 1 ml pepsin ilave edilmiş ve tüp içeriği ultra saf su ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Tüpler 100 rpm. 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mide sindirimi boyunca mide içeriğinden 2, 10, 20, 30 ve 60. dakikalarda 1.5 mL örnek alınmıştır ve pH'ı 2 M NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak pepsin aktivitesi durdurulmuştur.

İnce bağırsak sindirimi: İnkübatörden alınan mide içeriğine 11 mL SIF, 2.5 mL safra çözeltisi eklenmiş ve 2 M NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlanmıştır. 5 mL pankreatin (100 U/mL) ve 40 µL $CaCl_2$ eklendikten sonra son hacim 40 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanmıştır. 100 rpm'de, 37 °C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden çıkan tüpler buz banyosuna alınarak hızlıca soğutulmuştur. Hızlı bir şekilde 8000g'de 4ºC'de 20 dakika santrifüj işlemine alınarak faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bağırsak sindirimi mL başına 50 µL 0.1M Pefabloc (enzim inhibitörü) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Süpernatant alınarak LC-Q-TOF ve SDS-Page analizi için 5000 Da ultrafiltrasyon ile molekül ağırlığına göre fraksiyonlanmış ve üstte kalan kısım SDS-Page analizi için altta kalan kısım LC-Q-TOF analizi için dondurularak saklanmıştır.

3.3.4.4. Açlık durumunda yetişkin sindirim modeli

Geç evre (açlık) yetişkin statik *in vitro* sindirim protokolü Thomas et al., (2004) ve Torcello-Gómez et al., (2020)'e göre yapılmıştır. Bu model aynı zamanda proteinlerin allerjen etkisini belirlemek için EFSA tarafından önerilen yöntemdir. Açlık durumunda yetişkin sindirim modeli mercimek ve mercimek unu için oral sindirim, mide sindirimi ve ince bağırsak sindirimi aşamalarından, protein izolatı

için mide ve ince bağırsak sindirimi aşamalarından oluşmaktadır. Mide fazında, 0.5 mL protein izolatı (5 mg/mL) veya katı gıdadan 1 g oral bolus, 5:95 (v/v) oranında SGF ile karıştırılarak pH, 1.2'ye ayarlanmıştır (Tablo 3). Mide sindiriminden sonra, mide kimüsü hemen ince bağırsak sindirimine tabi tutulmuştur. İnce bağırsak sindirim protokolündeki (Brodkorb et al., 2019) diğer koşullar (enzim aktivite tayinleri, enzimler, sindirimin durdurulması) (Tablo 3) aynı şekilde uygulanmıştır.

Ağız sindirimi: Ağızdaki mekanik sindirimi modellemek için blenderdan geçirilmiş olan pişmiş mercimekten 0.25 g, mercimek ununda 0.25 g alınmış, üzerine 0.25 mL ultra saf su eklenmiştir. Örnek üzerine 0.4 mL SSF, 0.0025 mL 0.3 M $CaCl_2$ ilave edilmiş ve ultra saf su ile hacim 0.950 mL'ye tamamlandıktan sonra 0.05 ml α-amilaz çözeltisi (75 U/mL) ilave edilmiştir. Tüpler 100 rpm, 37 °C'de 2 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Böylece sindirimin ağız aşaması tamamlanmıştır.

Mide sindirimi: Ağız sindiriminden alınan içeriğe 15.2 mL SGF eklenmiştir. Pepsinin çalışabilmesi için ortamın asitliği 6 M HCl ile pH 1.2'ye ayarlanmıştır. pH ayarlamalarında harcanan çözelti miktarları kaydedilmiş ve hacim ayarlamalarında eklenecek saf su miktarından çıkarılmıştır. Son hacimde ortamda 2500 U/mL pepsin içerecek şekilde 1 mL pepsin ilave edilmiş ve tüp içeriği ultra saf su ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Tüpler 100 rpm, 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mide sindirimi boyunca mide içeriğinden 2, 10, 20, 30 ve 60. dakikalarda 1.5 mL örnek alınmış ve pH 2 M NaOH ile pH 7'ye ayarlanarak pepsin aktivitesi durdurulmuştur.

İnce bağırsak sindirimi: İnkübatörden alınan mide içeriğine 11 mL SIF, 2.5 mL safra çözeltisi eklenmiş ve 2 M NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlanmıştır. 5 mL pankreatin (100 U/mL) ve 40 µL $CaCl_2$ eklendikten sonra son hacim 40 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanmıştır. 100 rpm'de, 37 °C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden çıkan tüpler buz banyosuna alınarak hızlıca soğutulmuştur. Hızlı bir şekilde 8000g'de 4ºC'de 20 dakika santrifüj işlemine alınarak faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bağırsak sindirimi mL başına 50 µL 0.1M Pefabloc (enzim inhibitörü) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Süpernatant alınarak LC-Q-TOF ve SDS-Page analizi için 5000 Da ultrafiltrasyon

ile molekül ağırlığına göre fraksiyonlanmış ve üstte kalan kısım SDS-Page analizi için altta kalan kısım LC-Q-TOF analizi için dondurularak saklanmıştır.

Tablo 3 Sindirim protokollerinin özeti

	Bebek sindirim	Tokluk durumundaki yetişkin sindirim	Açlık durumundaki yetişkin sindirim
Ağız aşaması (2 dk., 37 ̊C)	5 g parçalanmış katı gıda 50:50 (w/v) oranında SSF ile karıştırılır (pH 7). SSF: KCl (15.1 mM) KH_2PO_4 (3.7 mM) $NaHCO_3$ (13.6 mM) $MgCl_2(H_2O)_6$ (0.15 mM) $(NH_4)_2CO_3$ (0.06 mM) pH: 7 $CaCl_2$ (son hacimde 0.75 mM) eklenir Tükürük α-amilaz aktivitesi son hacimde 75 U/mL	5 g parçalanmış katı gıda 50:50 (w/v) oranında SSF ile karıştırılır (pH 7). SSF: KCl (15.1 mM) KH_2PO_4 (3.7 mM) $NaHCO_3$ (13.6 mM) $MgCl_2(H_2O)_6$ (0.15 mM) $(NH_4)_2CO_3$ (0.06 mM) pH: 7 $CaCl_2$ (son hacimde 0.75 mM) eklenir Tükürük α-amilaz aktivitesi son hacimde 75 U/mL	0.5 g parçalanmış katı gıda 50:50 (w/v) oranında SSF ile karıştırılır (pH 7). SSF: KCl (15.1 mM) KH_2PO_4 (3.7 mM) $NaHCO_3$ (13.6 mM) $MgCl_2(H_2O)_6$ (0.15 mM) $(NH_4)_2CO_3$ (0.06 mM) pH: 7 $CaCl_2$ (son hacimde 0.75 mM) eklenir Tükürük α-amilaz aktivitesi son hacimde 75 U/mL
Mide aşaması (60 dk., 37 ̊C)	5 ml (5 mg/mL) protein izolatı veya 5 g katı gıda 63:37 (v/v) oranında SGF ile karıştırılır ve pH: 5.3 SGF: NaCl (94 mM) KCl (13 mM) pH: 5.3 (1 M HCl ile) Kimüs son hacminde pepsin aktivitesi 268 U/mL pH: 7 (1M NaOH ile)	5 ml (5 mg/mL) protein izolatı veya 5 g katı gıda 50:50 (v/v) oranında SGF ile karıştırılır ve pH: 3 SGF: NaCl (47.2 mM) KCl (6.9 mM) KH_2PO_4 (0.9 mM) $NaHCO_3$ (25 mM) $MgCl_2(H2O)_6$ (0.1 mM) $(NH_4)_2CO_3$ (0.5 mM) pH: 3 (1 M HCl ile) Başlamadan önce $CaCl_2$ (SIF son hacminde 0.075 mM) eklenir Son hacimde; Pepsin aktivitesi 2000 U/mL	0.5 ml (5 mg/mL) protein izolatı veya 1 g katı gıda 5:95 (v/v) oranında SGF ile karıştırılır ve pH: 1.2 SGF: NaCl (35 mM) pH: 1.2 (1M HCl) Son hacimde; Pepsin aktivitesi 2500 U/mL ya da 10 U/µg test izole protein

Bağırsak aşaması (60 dk., 37˚C)	Mide kimüsü 62:38 (v/v) oranında SIF ile karıştırılır ve pH: 6.6 (1 M HCl) SIF: NaCl (164 mM) KCl (10 mM) $NaHCO_3$ (85 mM) pH: 7 Başlamadan önce $CaCl_2$ (SIF son hacminde 3 mM) eklenir Son hacimde; Safra tuzları kons. 3.1 mM Tripsin aktivitesi 16 U/mL Kimotripsin aktivitesi 4 U/mL	Mide kimüsü 50:50 (v/v) oranında SIF ile karıştırılır ve pH: 7 (1 M NaOH ile) SIF: NaCl (38.4 mM) KCl (6.8 mM) KH_2PO_4 (0.8 mM) $NaHCO_3$ (85 mM) $MgCl_2(H2O)_6$ (0.33 mM) pH: 7 Başlamadan önce $CaCl_2$ (SIF son hacminde 0.3 mM) eklenir Son hacimde; Safra tuzları kons. 10 mM Tripsin aktivitesi 100 U/mL Kimotripsin aktivitesi 25 U/mL	Mide kimüsü 50:50 (v/v) oranında SIF ile karıştırılır ve pH: 7 (1 M NaOH ile) SIF: NaCl (38.4 mM) KCl (6.8 mM) KH_2PO_4 (0.8 mM) $NaHCO_3$ (85 mM) $MgCl_2(H2O)_6$ (0.33 mM) pH: 7 Başlamadan önce $CaCl_2$ (SIF son hacminde 0.3 mM) eklenir Son hacimde; Safra tuzları kons. 10 mM Tripsin aktivitesi 100 U/mL Kimotripsin aktivitesi 25 U/mL

3.3.5. Protein profili (SDS- Page analizi)

Pişmiş mercimek, mercimek unu ve mercimek protein izolatının mide sindirimi sonrası ve ince bağırsak sindirimi sonrasında protein profili SDS-Page analizi ile belirlenmiştir. Gerekli çözeltilerin hazırlanması ve analizin yapılışı ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

SDS-Page uygulamalarında Bio-Rad Mini Protean elektroforez sistemi ve Mini Protean® TGX^{TM} %12'lik ayırma jeli hazır olarak kullanılmıştır. Jele yüklenecek örnekler, protein miktarı 1 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Sindirim örnekleri 1:1 oranında örnek tamponu ile 95 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Sindirim öncesi örnekler ise 37 °C'de 15 dakika inkübe dilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnekler 10 µL olarak kuyucuklara yüklenmiş ve 75 V sabit voltajda elektroforez işlemi başlatılmıştır. Yarım saat sonra 100 V'a yükseltilmiştir. Örnekler jel kasetinin sonundaki siyah çizgiye kadar yürüdükten sonra girişim olmaması için akım durdurulmuştur. Tabakalar arasından dikkatle çıkarılan jel solusyon 1 (50 ml) içeren kaba aktarılmış ve 30 s mikrodalgada tutulduktan sonra

oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Orbital çalkalayıcıda 50 rpm sabit hızda 5 dakika bekletildikten sonra solüsyon 1 dökülmüştür. Solusyon 2 eklendikten sonra (50 ml) 1 mL boyama çözeltisi (Comessie Brillant Blue) ilave edilmiştir. 30 sn mikrodalga uygulamasını takiben orbital çalkalayıcıda 50 rpm sabit hızda 1 gece boyunca bekletilmiştir. Boyama işlemi tamamlanınca jel tridistile su ile yıkanmıştır. Kaba tridistile su eklenerek boyanın iyice uzaklaşması için 1 gece boyunca beklenmiş ve ertesi gün jelin fotoğrafı çekilerek görüntüsü alınmıştır (Laemmli, 1970).

Yürütme Tamponu (Running Buffer); pH:8.3

Tris bazı 3.0275 g

Glisin 14.4 g

%20 SDS

Ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Örnek Tamponu (Sample Buffer); (8 ml)

62.5 mM Tris-HCl pH 6.8

%25 Gliserol 2 mL,

%0,01 Bromfenol mavisi 0.08 mL,

%2 SDS 1.6 mL,

Ultra saf su 2.92 mL

% 5 β-Mercaptoethanol 0.4 mL

*β-Mercaptoetanol analizde kullanılmadan hemen önce eklenmiştir.

Solüsyon 1;

125 mL (%50) etanol.

25 mL (%10) asetik asit

Ultra saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Solüsyon 2;

1.25 mL (%5) etanol.

1.87 mL (%7.5) asetik asit

Ultra saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

Boya çözeltisi (Comessie Mix);

% 0.25 Comessie Blue Brilliant Blue R

% 95'lik etanol ile çözülmüştür

3.3.6. ImageJ analizi ve molekül ağırlıkların hesaplanması

SDS-Page analizi sonucu alınan bant görüntülerinin yoğunluk ölçümü ImageJ programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, programa yüklenen görüntüden gürültüler silinmiştir. Ardından "set measurement" kısmından "integrated density" ayarı yapılmış ve "analyse measure" sekmesi kullanılarak yoğunluklar hesaplanmıştır. SDS-Page jellerinde görüntü veren standart protein bantları arasındaki mesafe kullanılarak logaritmik grafik oluşturulmuştur. Jelde görüntü veren örneklerin yaklaşık molekül ağırlıkları grafikten elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.7. Molekül ağırlıklarına göre ayırma

İnce bağırsak sindirimi sonunda elde edilen sıvı kısım kaba filtre kağıdından süzülmüş ve molekül ağırlık sınır değeri (MAS) 5000 Da'luk membrana sahip ultrafiltrasyon tüplerine alınarak 6000 g'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada her bir süpernatant maksimum 15'er mL'lik hacimler halinde 2 kez tüpten geçirilmiştir. Filtrenin altında kalan MA <5000 Da fraksiyon ayrı bir falkon tüpte toplanmıştır. Örnekler LC/Q-TOF/MS analizi için analiz gününe kadar dondurularak -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.8. LC/Q-TOF/MS analizi

Liyofilize örneklere 1 mL saf su eklenmiş ve proteinler 1 mL etanol eklenerek çöktürülmüştür. Çözelti vortekslenmiş ve 0.22 µm PTFE filtreden geçirilmiş ve LC/Q-TOF/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Kromatografik ayırım; ikili pompa, gaz giderici, otomatik örnek dağıtıcı ile donatılmış bir HPLC Agilent 1260 Infinity serisi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Poroshell 120 EC-C18 (3.0X100 mm, parçacık boyutu 2.7 µm) (Agilent) kolonu bileşikleri ayırmak için tercih edilmiştir. Mobil fazlar tabloda verilen basamaklara dayanan gradient elüsyonu kullanılarak, su ve %0.1 formik asit karışımı mobil faz A ve asetonitril mobil faz B olarak kullanılmıştır. Kolon 35 °C 'de tutulmuş, enjekte edilen örnek hacmi 5 µL ve kullanılan akış oranı 0.40 mL / dk. olarak belirlenmiştir. Gradient elüsyonu şu şekildedir: 0–0.5 min, 10% B; 0.5–8 min, 25% B; 8–16 min, 50% B; 16–24 min, 75% B; 24–30 min, 95% B; 32–38 min, 5% B; kolon şartlanması için 38-42 min, 5%B.

MS analizi, kurutucu gaz akışı 14.0 L / dakika; nebilözör gaz basıncı 35 psi; kurutucu gaz sıcaklığı 290 °C; sheath gaz sıcaklığı 400 °C; sheath gaz akışı 12 L/dk. azotta pozitif iyonda çalışan Agilent Dual Jet Stream elektrosprey iyonizasyon (Dual AJS ESI) arayüzü ile donatılmış bir Agilent 6550 iFunnel yüksek çözünürlüklü Doğru Kütle LC-Q/TOF-MS kullanılarak yürütülmüştür. Kütle spektrumları, 50-3200 m/z 'lik bir kütle aralığında pozitif iyonizasyon modunda kaydedilmiştir. Entegrasyon ve veri detaylandırma “Agilent MassHunter Workstation” ve `Agilent BioConfirm` yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.9. Protein sekanslarının belirlenmesi

Protein sekanslarının seçimi için UniProtKB (https://www.uniprot.org/) veri tabanından yararlanılmıştır. Taramalar sırasında bilimsel adlar ve protein adı verilerek arama yapılmıştır (*Lens culinaris (Lentil) (Cicer lens)*).

UniProt Bilgi Bankası (UniProtKB) zengin açıklamalarla proteinler hakkında işlevsel bilgilerin toplandığı bir merkezdir. Her bir UniProtKB girişi için zorunlu olan temel verileri (amino asit dizisi, protein adı veya açıklaması, taksonomik veriler ve alıntı bilgileri) mümkün olduğunca fazla açıklama bilgisi eklenir. MS-Digest programı kullanılarak kullanılan enzimlere karşılık açığa çıkabilecek peptitlerin belirlenen protein moleküler ağırlıkları, LC/Q-TOF/MS analizi sonuçları eşleştirilerek peptitler tanımlanmıştır. Bu program California Üniversite'nin gizli ve tescilli ürünüdür.

3.3.10. Biyoaktif peptitlerin tahmini

PeptideRanker, biyoaktif peptitlerin tahmini için bir sunucudur. Peptitlerin biyoaktivite skorları, peptitin biyoaktif olma olasılığına göre PeptideRanker sunucusunda belirlenir. Bunun biyoaktivite derecesinin bir tahmini olmadığını belirtmek önemlidir. Bu yöntem, bir dizi peptit arasından biyoaktif olma olasılığı daha yüksek olanları belirlemek için yararlı olabilmekte ve deneysel taramanın bu alt kümeye odaklanmasına olanak tanımaktadır. PeptideRanker, her peptit için o peptitin biyoaktif olma olasılığını (0 ile 1 arasında) tahmin eder. Tahmin edilen olasılık 1'e ne kadar yakınsa, PeptideRanker, peptidin biyoaktif olduğundan o kadar emin olur (Mooney et al., 2012).

3.3.11. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi. IBM SPSS Stastics 25 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA, Tukey ve Duncan çoklu karşılaştırma metotları ile $p \leq 0.05$ önem seviyesinde değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalar ise Student's t-testi ile $p \leq 0.05$ önem seviyesinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Analizleri

Mercimeğin protein miktarı 21.20 ± 0.29 g/100 g olarak saptanmıştır. Mercimek için hesaplanan protein miktarı literatürde mercimek için belirtilen

protein değerlerine göre (%26.59 ve %27.30) (Barbana et al., 2013; Aryee and Boye, 2016) daha düşük bulunmuştur. Mercimek proteini izolatında ise BCA analizi ile saptanan protein miktarı %65 olarak bulunmuştur. Hernandez et al., (2020) mercimek proteini izolatındaki protein miktarının %75 olduğunu bildirmiştir.

Pişmiş mercimek, un haline getirilmiş mercimek ve protein izolatı örneklerinin mide sindirimi boyunca 5 farklı (2, 10, 20, 30, 60. dakika) sürede BCA analizi ile elde edilen protein değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4 Örneklerin protein miktarları (mg/mL)

Örnek	Sindirim protokolü	Mide 2. dakika	Mide 10. dakika	Mide 20. dakika	Mide 30. dakika	Mide 60. dakika
Un (U)	Açlık durumu	1.92±0.16^{a}	1.93±0.65^{a}	1.97±0.19^{a}	1.83±0.23^{a}	2.19±0.23^{a}
	Tokluk durumu	13.28±1.46^{a}	13.05±2.40^{a}	13.20±2.09^{a}	13.11±1.70^{a}	16.05±2.37^{a}
	Bebek	8.52±2.38^{a}	10.61±1.55^{a}	12.97±2.35^{a}	13.03±3.62^{a}	12.97±2.82^{a}
Pişmiş mercimek (PM)	Açlık durumu	0.77±0.18^{a}	0.70±0.21^{a}	0.85±0.11^{a}	1.10±0.23^{a}	1.36±0.17^{b}
	Tokluk durumu	1.34±0.25^{a}	1.57±0.45^{a}	1.68±0.53^{a}	1.80±0.22^{a}	1.96±0.31^{a}
	Bebek	1.29±1.00^{a}	1.59±0.94^{a}	1.59±0.86^{a}	1.72±1.14^{a}	2.08±1.22^{a}
Mercimek Protein İzolatı (MPİ)	Açlık durumu	0.54±0.11^{a}	0.58±0.1^{a}	0.58±0.02^{a}	0.54±0.15^{a}	0.66±0.05^{a}
	Tokluk durumu	0.82±0.40^{a}	0.98±0.40^{a}	0.98±0.44^{a}	1.16±0.44^{a}	1.27±0.54^{a}
	Bebek	0.27±0.20^{a}	0.33±0.34^{a}	0.35±0.36^{a}	0.37±0.35^{a}	0.45±0.43^{a}

$^{a-b}$: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Proteinin makromoleküler yapısının, peptit bağları sayısının ve belirli dört amino asit (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) varlığının BCA ile kompleks oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Wiechelman, 1988). Pişmiş mercimeğin açlık durumundaki *in vitro* mide sindirimi dışında diğer tüm örneklerin mide sindirimleri sürecinde farklı zamanlarda alınan sindirim karışımlarındaki protein miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Ancak pişmiş mercimeğin açlık durumunda 60 dakikalık mide sindirimi sonrasında diğer sürelere kıyasla daha yüksek protein miktarı saptanmıştır ($p<0.05$). Bu durum, gıdanın tamponlama etkisi ile birlikte açlık durumu mide koşullarını pH 1.2'den pepsin enzimi aktivitesi için optimum değer olan pH 2-3

civarına yaklaştırarak, enzimin aktivitesi dolayısıyla protein hidrolizinin arttırması sebebiyle meydana gelmiş olabilir. Tüm süreler için protein sonuçları değerlendirildiğinde *in vitro* mide sindirimi boyunca pepsin enzimi varlığında gerçekleşen proteoliz nedeniyle protein artışı olmuştur. Mide sindiriminin başlangıcında (2. dakika) sindirimin yeni başladığı düşünüldüğünde protein değerlerinin mide sindiriminin bitimine (60. dakika) doğru artması beklenen bir durumu oluşturmaktadır.

Örneklerin *in vitro* mide sindirim ortamındaki başlangıç protein miktarları ve mide sindirimi sırasında açığa çıkan yüzde değerleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5 Örneklerin in vitro mide sindirimi sırasında ortamdaki çözünür protein miktarı (%)

Örnek	Sindirim protokolü	Mide başlangıcında protein miktarı (mg/mL)	*İn vitro* mide sindirimi sırasında ortamdaki çözünür protein miktarı (%)				
			2.dakika	10.dakika	20.dakika	30.dakika	60.dakika
Un	Tokluk durumu	26.50	50.11±5.33^{a}	49.25±10.12^{a}	49.81±9.23^{a}	49.47±6.12^{a}	60.57±10.27^{a}
	Bebek	33.30	25.59±7.25^{a}	31.87±4.09^{a}	35.95±4.30^{a}	34.61±6.77^{a}	35.96±4.99^{a}
	Açlık durumu	2.65	72.27±3.06^{a}	72.91±0.54^{a}	74.34±6.73^{a}	69.08±0.63^{a}	82.81±6.64^{a}
PM	Tokluk durumu	6.63	20.3±4.48^{a}	23.74±7.98^{a}	25.35±8.92^{a}	27.15±4.05^{a}	29.63±5.63^{a}
	Bebek	8.35	15.45±4.77^{a}	19.10±3.74^{a}	19.01±2.44^{a}	20.64±6.42^{a}	24.91±3.81^{a}
	Açlık durumu	0.66	86.32±10.75^{a}	91.74±7.94^{a}	94.49±5.25^{a}	103.07±3.59^{a}	107.99±1.41^{b}
MPİ	Tokluk durumu	1.63	50.07±10.30^{a}	60.44±10.01^{a}	60.32±12.88^{a}	71.37±12.84^{a}	77.94±10.42^{a}
	Bebek	2.05	24.40±1.08^{a}	29.35±1.38^{a}	30.87±1.54^{a}	32.33±0.51^{a}	40.35±1.54^{a}
	Açlık durumu	0.81	67.28±5.28^{a}	72.25±2.58^{a}	71.88±1.48^{a}	66.45±15.14^{a}	82.03±2.33^{a}

$^{a-b}$: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

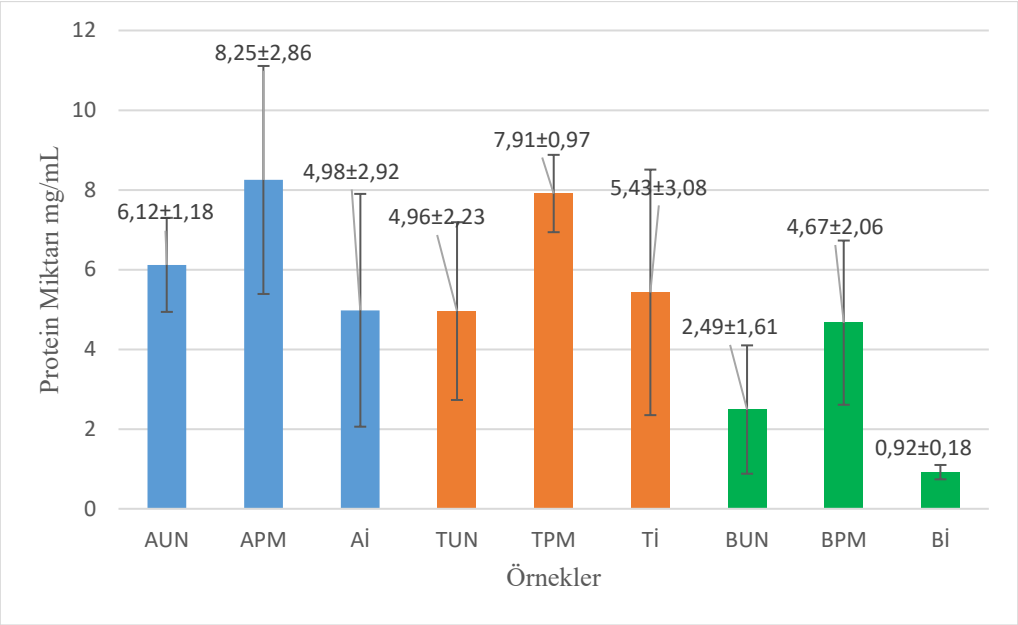
PM: Pişmiş mercimek; MPİ: Mercimek proteini izolatı

Gıda örneklerinin başlangıç protein miktarları ve sindirim sonucunda BCA analizi ile elde edilen protein miktarları hesaba katılarak sindirim boyunca başlangıç proteinin yüzde kaçının çözündüğü hesaplanmıştır. Genel olarak örneklerin mide sindirimi boyunca 5 farklı sürede açığa çıkan proteinlerin yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak pişmiş mercimeğin

açlık durumunda proteinlerin tamamının çözündüğü görülmektedir. Başlangıç protein miktarlarına kıyasla hesaplanan çözünen protein yüzdeleri tüm açlık durumu örneklerinde diğer sindirim protokollerine göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum Torcello-Gomes et al., (2020) çalışmasında yer alan fıstık ve ekmek proteinleri açlık sindirimi sonuçlarının tokluk ve bebek sindirimi sonuçları arasındaki farklılık ile paralellik göstermektedir.

Açlık durumunda, pepsin enziminin substrata erişim kolaylığı ve pH koşullarının gıdanın tamponlama etkisi ile birlikte pepsin enzimi aktivitesini optimuma yaklaştırması neticesinde proteoliz etkin gerçekleşmiş olabilir. Açlık durumunda mide pH'ı yaklaşık 2 veya altındadır. Yemeğin yutulması sırasında, öğünün tampon kapasitesine bağlı olarak pH yükselir. Bundan sonra, hidroklorik asit salgılanması nedeniyle pH giderek düşer. Asidin katı bir gıda bolusuna yavaş nüfuz etmesi, bolusun iç kısmında uzun süreli yüksek pH ile sonuçlanır. Tüm bunlar, mide boşalması sırasında öğünün farklı fraksiyonlarının farklı pH değerlerine ve enzim aktivitelerine maruz kaldığı anlamına gelir (Minekus et al., 2014). Tokluk sindirimi mide pH koşulları pepsin enzimi açısından optimum pH'da (pH:3) başlamış olsa da gıdanın tamponlaması ile birlikte pH yükselerek optimumdan uzaklaşmaktadır. Sağlıklı bireylerde yemek yeme esnasında pH 7.5'a kadar çıkabilmektedir. Mide pH'sı gıdanın mideye girişinden sonra 20 dakika içinde yükselmeye başlamaktadır Dolayısıyla açlık durumuna göre tokluk durumunda proteoliz etkinliği mide sindirimi sonuna doğru azalabilir (Çomak Göçer vd., 2016).

Mide aşamasından sonra bağırsak sindirimine geçen tüm örneklerin protein değerleri incelendiğinde ise pişmiş mercimek için saptanan protein miktarlarının daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 5).



Şekil 5 Örneklerinde ince bağırsak sindirimi sonunda saptanan protein miktarları (mg/mL)

AUN: Açlık durumunda mercimek unu sindirimi; TUN: Tokluk durumunda mercimek unu sindirimi; BUN: Bebek sindirim koşullarında mercimek unu sindirimi

Mide sindirimini takiben gerçekleşen bağırsak sindiriminde bağırsaktaki proteazlar (pankreatin, tripsin ve kimotripsin) varlığı ile gerçekleşen proteoliz de protein miktarında artış sağlamıştır. Tokluk ve bebek sindirim sıvılarında doygunluk (sindirim sıvısının mL'si başına gıda) açlık durumundaki sindirime göre daha yüksektir. Bebek bağırsak sindiriminin gerçekleştiği tüm örneklerde diğer sindirim protokollerine göre protein miktarı düşük bulunmuştur. Bebek sindirimindeki proteolizin etkinliği, sindirim koşulları (pH koşulları, sindirim sıvısı:gıda oranı, enzim:substrat erişimi vb.,) sebebi ile daha düşük sonuçlanmış olabilir (Menard et al., 2018; Torcello-Gomez et al., 2020).

4.2. Protein Hidroliz Derecesi (HD)

Pişmiş mercimek, mercimek unu ve protein izolatı örneklerinin mide sindirimi boyunca 5 farklı (2, 10, 20, 30 ve 60 dakika) sürede açığa çıkan amino gruplarının spektrofotometrik ölçümüne dayanan o-fitaleldahit (OPA) metodu ile elde edilen protein hidroliz dereceleri (HD) Tablo 6'da verilmiştir. Mercimek ununun açlık koşullarındaki mide sindirimi sırasında içerdiği proteinlerin %3.74 ±

2.50 düzeyinde hidrolize olduğu saptanmıştır. Tokluk durumunda ise bu değerin %58.90 ± 3.53'e kadar yükseldiği ve mide sindiriminin 20. dakikasından sonra hidroliz derecesinin %50'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Tüm örnekler ve tüm *in vitro* mide sindirim koşulları kıyaslandığında en yüksek hidroliz derecesi mercimek ununun tokluk durumundaki sindirimi için elde edilmiştir ($p<0.05$). Açlık durumu mide sindirimi koşullarında un ve pişmiş mercimek proteinlerinin hidrolizi tokluk durumundaki sindirim koşullarına göre daha düşük olarak saptanmıştır. Un ve pişmiş mercimek örneklerinin açlık ve tokluk sindirimi hidroliz değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak mercimek protein izolatı için açlık ve tokluk sindirim değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

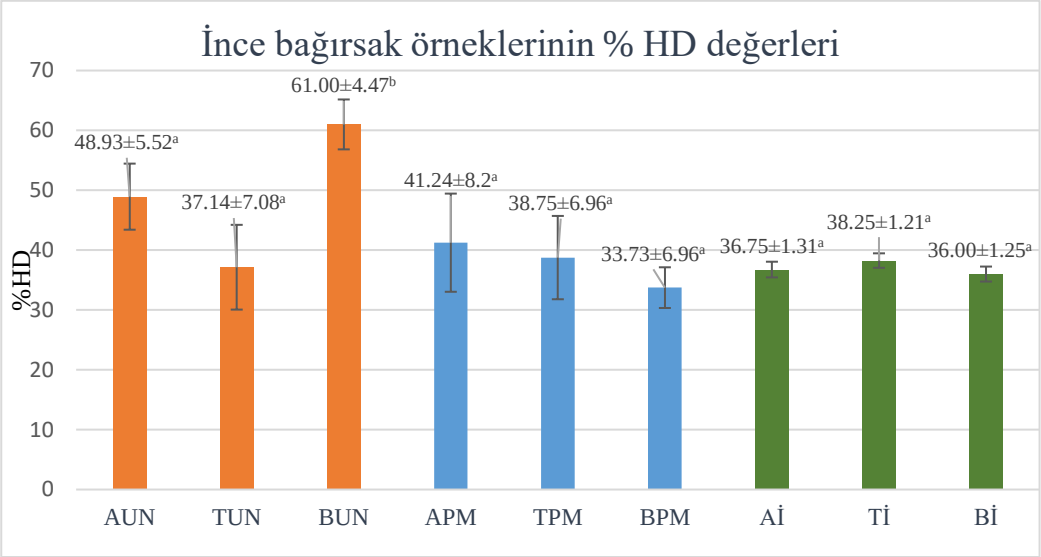
Tablo 6 Örneklerin protein hidroliz dereceleri (%)

Örnek	Sindirim protokolü	Mide 2. dakika	Mide 10. dakika	Mide 20. dakika	Mide 30. dakika	Mide 60. dakika
Un (U)	Açlık durumu	2.97±1.63^{a}	3.40±2.10^{a}	3.52±2.40^{a}	3.63±2.63^{a}	3.74±2.50^{a}
	Tokluk durumu	38.65±2.33^{a}	39.30±1.34^{a}	50.84±2.94^{b}	51.50±1.44^{b}	58.90±3.53^{b}
	Bebek	22.45±4.06^{a}	23.09±4.11^{a}	25.09±2.86^{a}	26.35±4.78^{a}	30.30±1.45^{a}
Pişmiş mercimek (PM)	Açlık durumu	1.78±0.63^{a}	1.76±0.84^{a}	1.91±1.04^{a}	1.90±0.99^{a}	2.42±1.23^{a}
	Tokluk durumu	8.64±2.04^{a}	8.00±1.64^{a}	8.17±1.64^{a}	8.79±1.32^{a}	12.78±3.07^{a}
	Bebek	25.77±3.09^{a}	23.80±2.64^{a}	24.83±2.52^{a}	26.29±1.16^{a}	26.51±2.27^{a}
Mercimek Protein İzolatı (MPİ)	Açlık durumu	28.05±0.12^{a}	29.85±0.24^{a}	31.05±0.10^{a}	31.95±0.14^{a}	35.25±0.21^{a}
	Tokluk durumu	12.3±0.40^{a}	29.55±0.13^{b}	30.15±0.12^{b}	31.35±0.15^{b}	35.55±0.20^{b}
	Bebek	28.5±0.17^{a}	30.45±0.23^{a}	28.05±0.07^{a}	25.8±0.38^{a}	29.4±0.04^{a}

$^{a-b}$: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Örneklerin başlangıç protein miktarlarının birbirinden farklı olması %HD değerlerine de yansımıştır. Bu durumdan dolayı her örneğin %HD değeri artış oranı (mide sindiriminin başlangıcından (2.dakika) mide sindiriminin sonuna (60.dakika) doğru olan %HD değerleri) hesaplanmıştır. Pişmiş mercimekteki proteinlerin açlık (yetişkin) *in vitro* mide sindirim sonuçları incelendiğinde %HD artışının aynı koşullardaki un örneği için saptanan %HD değeri artışından daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu durum ısıl işlemin etkisini göstermesi açısından

önemlidir. Aynı durumun un ve pişmiş mercimek tokluk sindirimi %HD değerleri arasında gerçekleşmediği ve aralarında anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır ($p>0.005$). Bebek sindirimi koşullarında un ve pişmiş mercimek proteinlerinin hidrolizi ise birbirine yakın bulunmuştur. Protein izolatının açlık koşullarındaki *in vitro* mide sindirimi sırasında içerdiği proteinlerin hidroliz artış derecesi tokluk koşullarına göre daha yüksek olarak saptanmıştır.



Şekil 6 İnce bağırsak *in vitro* sindirim örneklerinin % HD değerleri

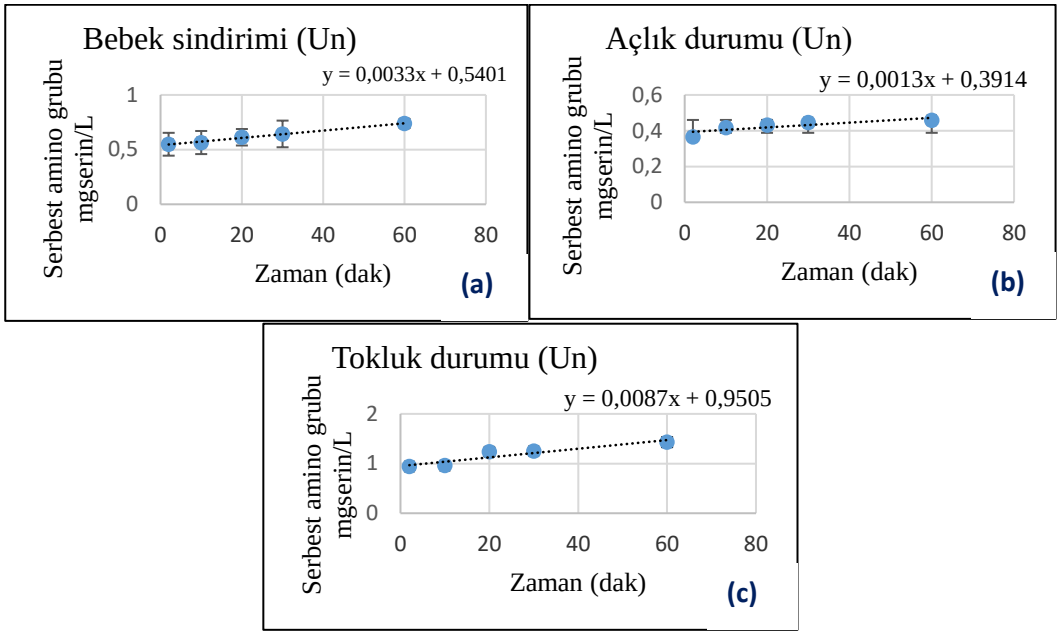
[a, b] Farklı harfler aynı gıda için *in vitro* ince bağırsak sindirimi sonundaki %HD değerleri arasındaki istatistiksel olarak farklılığı ifade eder ($p<0.05$).

AUN: Açlık durumunda mercimek unu sindirimi; TUN: Tokluk durumunda mercimek unu sindirimi; BUN: Bebek sindirim koşullarında mercimek unu sindirimi; APM: Açlık durumunda pişmiş mercimek sindirimi; TPM: Tokluk durumunda pişmiş mercimek sindirimi; BPM: Bebek sindirimi koşullarında pişmiş mercimek sindirimi; Aİ: Açlık durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Tİ: Tokluk durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Bİ: Bebek sindirimi koşullarında mercimek protein izolatı sindirimi

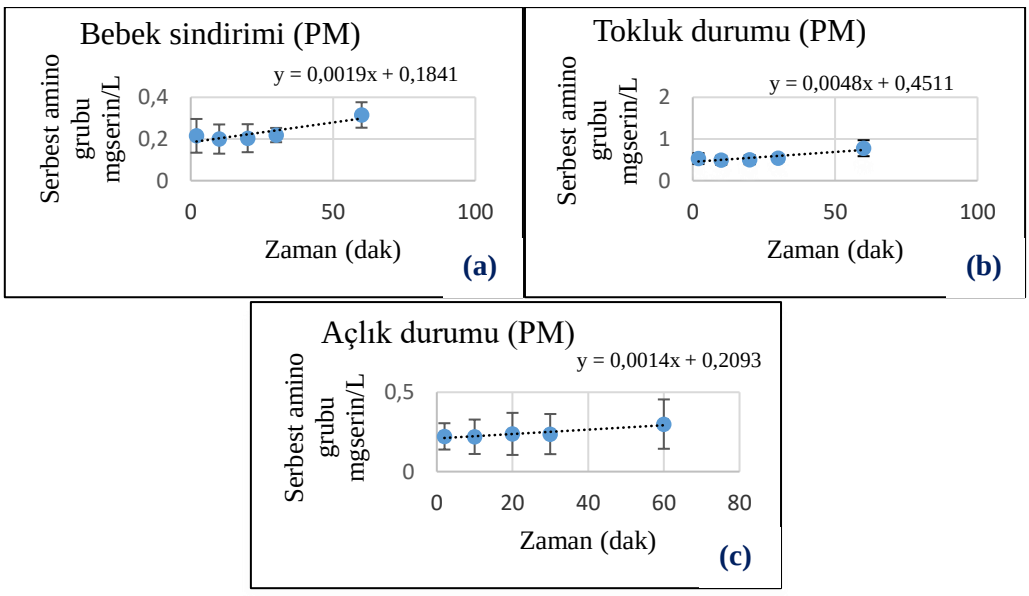
Mide sindirimini takiben gerçekleşen ince bağırsak sindiriminde, ince bağırsaktaki proteazların (pankreatin, tripsin ve kimotripsin) varlığı ile gerçekleşen proteoliz neticesinde protein hidroliz derecesinde bir miktar artış gözlenmiştir. Kaur et al., (2010), simüle edilmiş ince bağırsak koşulları altında pankreatin varlığında, mide sindiriminde sindirilmemiş proteinlerin ve peptik hidrolizatların daha fazla sindirildiğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada unlara ve protein izolatına mide pH'ında pepsin ve ardından ince bağırsak pH'ında pankreatin veya

tripsin ve α-kimotripsin eklendiğinde, HD değerleri %65.5 ile %82.4 arasında değişmiştir (Aryee and Boye, 2016). Bu sonuçlar bu tez çalışmasındaki toplam %HD (mide+bağırsak %HD değerleri) değerleri ile paralellik göstermektedir.

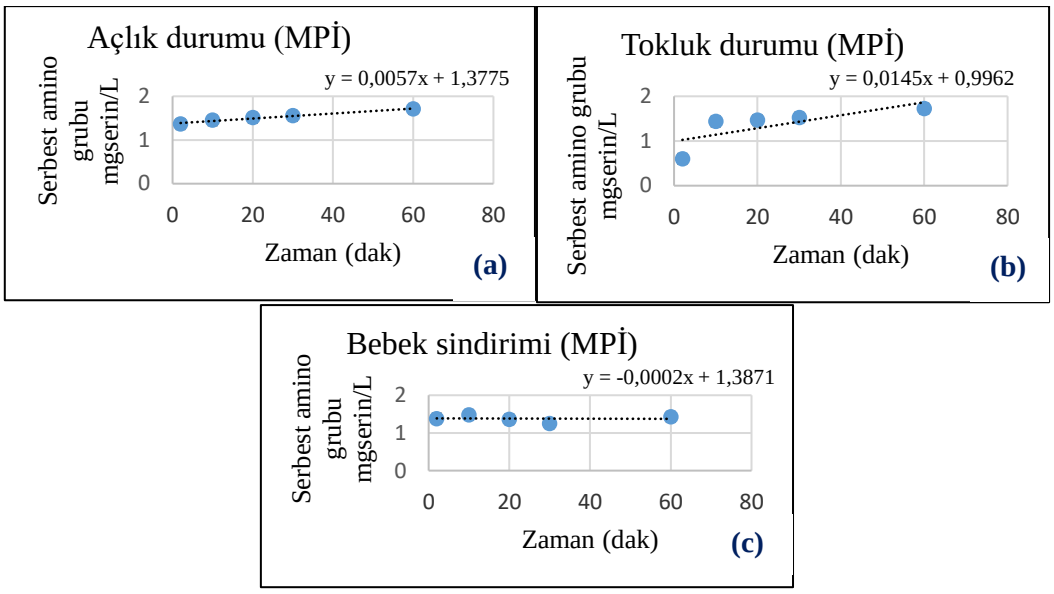
Mercimek protein izolatında *in vitro* mide sindirimi ve ince bağırsak sindiriminde yüksek seyreden hidroliz değerleri matris etkisini göstermesi açısından önemlidir. Bu sonuç, amino gruplarının ortaya çıktığının ve daha fazla sayıda hidroliz alanının mevcudiyetinin göstergesidir. Tokluk durumunda sindirilen mercimek proteini izolatının mide sindirimi boyunca %HD değerinin un halindeki mercimek ve pişmiş mercimeğe göre yaklaşık 1.5 kat daha fazla artması, izolat elde etme işlemi sırasında proteinde gerçekleşen olası modifikasyonlarla enzimin proteinde bağlanacağı bölgeye erişimin kolaylaşmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Aynı şekilde proteolitik enzimlere karşı daha yüksek duyarlılığın, pişirme işlemi ve protein izolatı elde edilmesinde kullanılan yöntemin yarattığı protein yapısındaki değişiklikler nedeniyle meydana gelmiş olabileceği daha önce açıklanmıştır. (Santos-Hernández et al., 2020). Mide aşamasından sonra ince bağırsak sindirimine geçen örneklerin protein hidroliz dereceleri incelendiğinde bebek sindirimi koşullarında mercimek unu için saptanan %HD değerlerinde yüksek bir artış görülmektedir. Bu artışın bebek sindirimi bağırsak koşullarının, yetişkin koşullarına benzerlik göstermesinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 7 Mercimek ununda mide sindirimi boyunca açığa çıkan serbest amino grupları (a) bebek sindirimi (b) açlık durumu (c) tokluk durumu



Şekil 8 Pişmiş mercimekte mide sindirimi boyunca açığa çıkan serbest amino grupları (a) bebek sindirimi (b) tokluk durumu (c) açlık durumu



Şekil 9 Mercimek proteini izolatında mide sindirimi boyunca açığa çıkan serbest amino grupları (a) açlık durumu (b) tokluk durumu (c) bebek sindirimi

Her bir örneğin mide sindirimi sürelerinde OPA analizi ile belirlenmiş serbest amino gruplarının miktarları Şekil 7, 8 ve 9'da verilmiştir. Grafik eğimleri dikkate alınırsa mide süresi boyunca gerçekleşen hidroliz hakkında yorum yapılabilir. Hidrolizde en fazla artış tokluk durumunda mercimek proteini izolatında, en düşük artış ise bebek sindirimi koşullarında mercimek proteini izolatında gerçekleşmiştir. Mercimek unu ve pişmiş mercimek örneklerinde protein hidrolizi, açlık durumunda tokluk durumuna göre daha sabit hızda ilerlemiştir. Midede gerçekleşen hidroliz seyrinin daha sabit ilerlemesi proteinlerin midede kalma sürelerinin daha uzun olduğunu yani yavaş sindirildiğinin göstergesidir. Bu durumda midede sindirimin etkin gerçekleşmediği ve dolayısıyla sindirime dirençli ve alerjen proteinlerin kaldığı yorumu yapılabilir (Asero et al., 2001; Thomas et al., 2004; Luo et al., 2015).

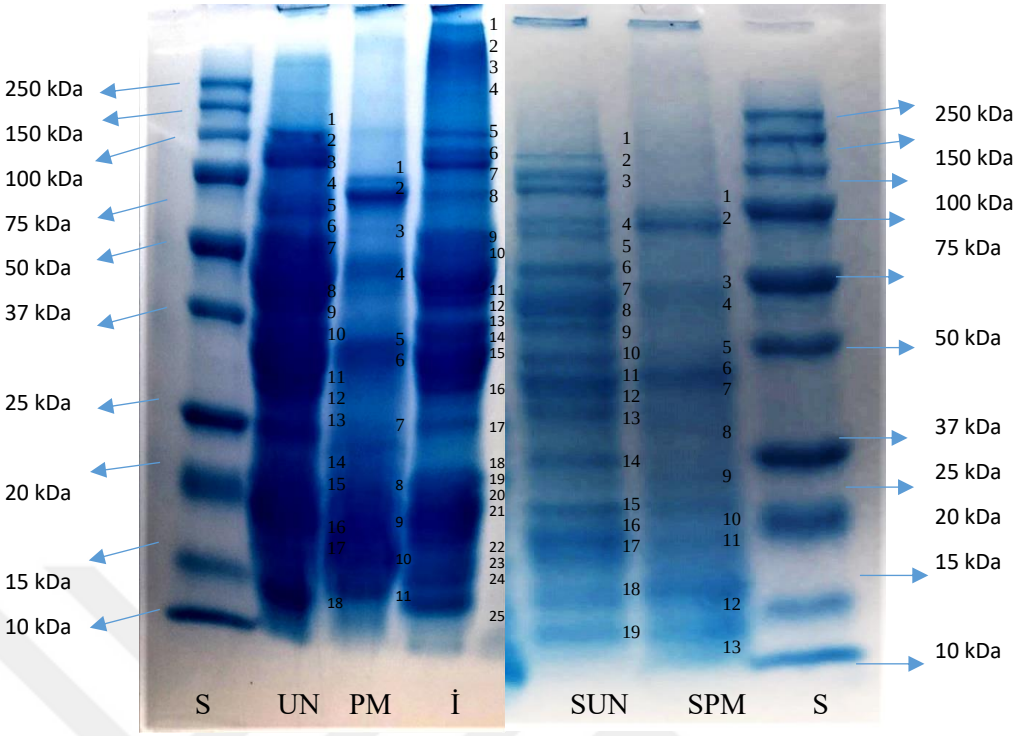
Örneklerin açlık ve tokluk durumunda midedeki ortalama hidroliz değerinden ince bağırsak sonunda toplam %HD değerine olan artış oranı dikkate alındığında, pişmiş mercimeğin un halindeki mercimeğe göre ~%8 daha fazla hidrolize olduğu Tablo 6 ve Şekil 6'daki HD değerlerinden hesaplanmıştır. Carbonaro et al., (2012) baklagil protein sindirilirliğini ısıl işlem tarafından indüklenen yapısal değişikliklerle ilişkilendirmiş ve işlenmemiş mercimek unu proteinlerindeki yüksek

β-tabaka içeriğinin protein sindirilirliği ile ters orantılı olduğunu öne sürmüştür. Vanga et al., (2015) protein sindirilirliğindeki artışı, ısıl işlem ile proteinin ikincil yapısında oluşan değişikliklere bağlamıştır. Çalışmamızda bebek sindiriminde ısıl işlemin olumlu etkisi görülmemiştir. Genel olarak tüm sindirim sonuçlarına bakıldığında ise ısıl işlem sindirimde çok önemli bir etki göstermemiştir. Bu durumu destekleyen bir çalışmada ise pişirme kaynaklı protein agregasyonu nedeniyle hem mide hem de bağırsak sindiriminde proteinlerin sindirilirliğinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir.

Ancak, ısıl işlem protein sindirilirliğini azaltan proteaz inhibitörlerini de inaktive ederek protein sindirilirliğinin artmasını sağlamaktadır. Genel olarak, pişirme ve protein ekstraksiyonunun, sonradan sindirilirliğe olumlu katkıda bulunabilecek anti-nutrisyonel bileşikleri azalttığı bildirilmiştir (Aryee and Boye., 2016). Daha önceden yapılmış birkaç çalışma bu durumu desteklemektedir. Tripsin inhibitörü ve fitik asit-fosfor gibi antinutrisyonel bileşiklerin azaltılması ve/veya etkisizleştirilmesinin yanı sıra bu bileşiklerin proteinlerle minimum etkileşimleri ve kompleks oluşumunun azaltılması, sindirilirliği artırmak için etkili bir strateji olarak önerilmiştir. Kırmızı ve yeşil mercimek protein izolatlarında kendi proteinlerine kıyasla daha düşük tripsin inhibitörü değerleri bulunmuştur, bu da protein ekstraksiyon prosedürü sırasında bazı tripsin inhibitörlerinin etkisini kaybettiğini düşündürmüştür (S´anchez-Vioque et al., 1999).

4.3. Protein Profili

İn vitro sindirim uygulanmamış mercimek protein izolatı, mercimek unu ve pişmiş mercimeğin protein profilleri Şekil 10'da görülmektedir. Sindirim uygulanmamış protein izolatında 25, mercimek ununda 19 ve pişmiş mercimekte 13 protein bandı tespit edilmiştir.



Şekil 10 Sindirilmemiş mercimek unu, pişmiş mercimek ve mercimek protein izolatı protein profilleri

S:*Standart, UN: Mercimek unu, PM: Pişmiş mercimek, İ: Mercimek proteini izolatı, SUN: Seyreltilmiş mercimek unu, SPM: Seyreltilmiş pişmiş mercimek*

İki görüntü incelendiğinde una göre ısı etkisiyle pişmiş mercimek proteinlerinin moleküler ağırlık (kDa) dağılımının küçüldüğü görülmektedir. Isıl işlem etkisi ile büyük moleküler ağırlıklı proteinler parçalanmıştır. Mercimek proteini izolatının protein profilinin ise geniş bir aralıkta olduğu görülmektedir. İzolat elde etme işlemi sayesinde un ve pişmiş mercimeğe göre geniş aralıkta dağılım göstermiştir (Tablo 7).

Tablo 7 Sindirilmemiş mercimek unu, pişmiş mercimek ve mercimek protein izolatı protein moleküler kütleleri

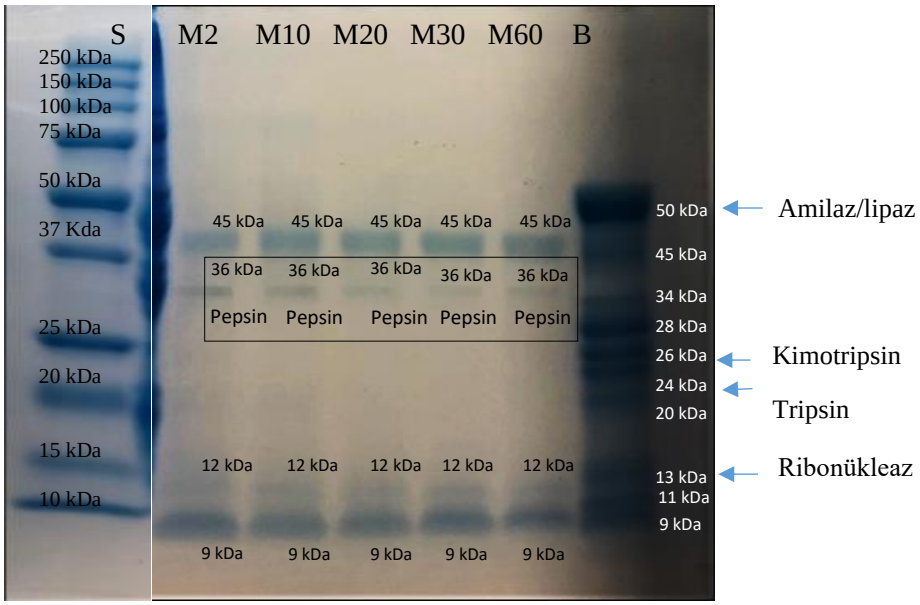
Bant numaraları	Moleküler ağırlıklar (kDa)		
	UN/SUN	PM/SPM	MPİ
1	122	77	695
2	97	72	460
3	89	48	97
4	75	34	89

5	69	32	82
6	57	30	70
7	45	28	55
8	48	25	56
9	42	22	50
10	36	21	48
11	33	18	43
12	32	16	40
13	30	12	38
14	25		35
15	21		32
16	19		30
17	18		27
18	15		25
19	12		21
20			20
21			18
22			16
23			12
24			10
25			<10

UN: Mercimek unu; SUN: Seyreltilmiş mercimek unu; PM: Pişmiş mercimek; SPM: Seyreltilmiş pişmiş mercimek; MPİ: Mercimek protein izolatı

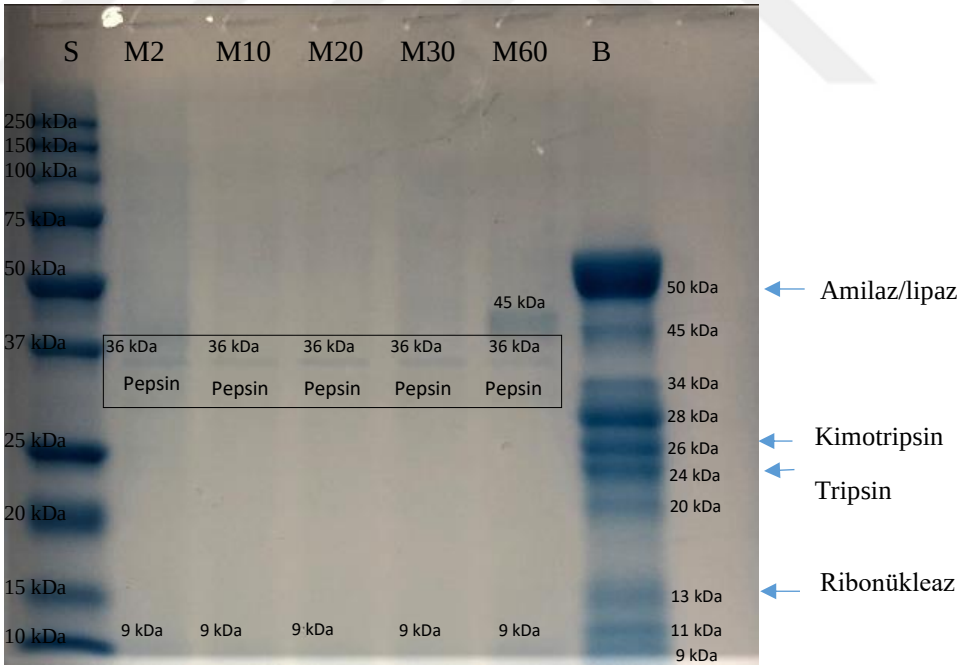
4.3.1. Açlık *in vitro* sindirim modeli

Açlık *in vitro* sindirim modelinde mercimek ununun (Şekil 11), pişmiş mercimeğin (Şekil 12) ve mercimek protein izolatının (Şekil 13) protein profili verilmiştir. *İn vitro* gastrointestial sindirimde kullanılan pepsin enziminin moleküler ağırlığı 34-40 kDa arasındadır. İntestinal sindirimde kullanılan pankreatinde çeşitli enzimler vardır. Bu enzimler ribonükleaz (13.7-14.7 kDa), proteaz (23.8-64 kDa), tripsin (24 kDa), amilaz (51-55.4 kDa), kimotripsin (25 kDa) ve lipazdır (45-50 kDa) (Jung et al., 2014; Sigma Aldrich, 2019). Mide ve mide-bağırsak sindirimi için örnek içermeyen, sadece enzimlerin olduğu örnekler de SDS-Page analizine tabi tutulmuş ve bu bantlar incelendiğinde pepsinin yaklaşık 34 kDa'da bant oluşturduğu, pankreatinin de 10-15 kDa, 20-25 kDa ve 50 kDa civarında bantlar oluşturduğu belirtilmiştir (Perçin ve Karakaya, 2020). Bu tez çalışmasında pepsin ~36 kDa, tripsin ~24 kDa, kimotripsin ~26 kDa, amilaz/lipaz ~ 50 kDa ve ribonükleaz ~13 kDa M_A civarında bant oluşturmuştur.



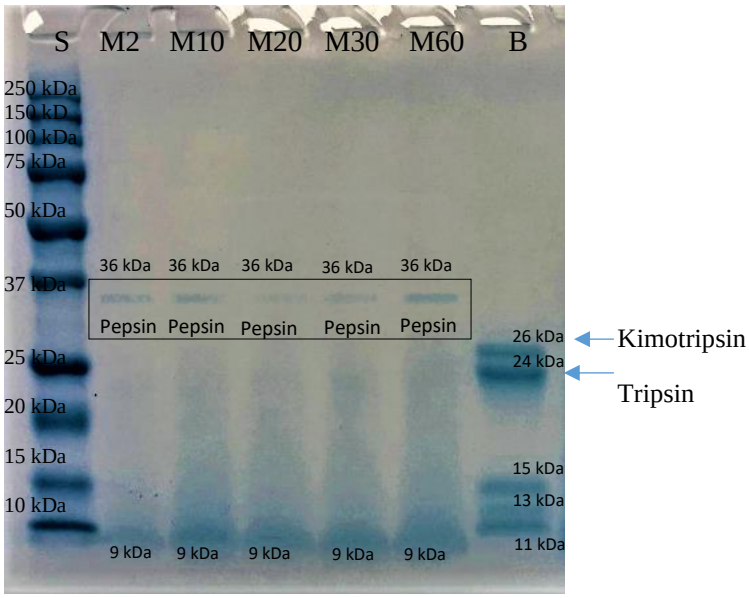
Şekil 11 Un halindeki mercimek için açlık durumunda mide ve bağırsak sindirimi

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 12 Pişmiş mercimek için açlık durumunda mide ve bağırsak sindirimi

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 13 Mercimek protein izolatı için açlık durumunda sindirim

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*

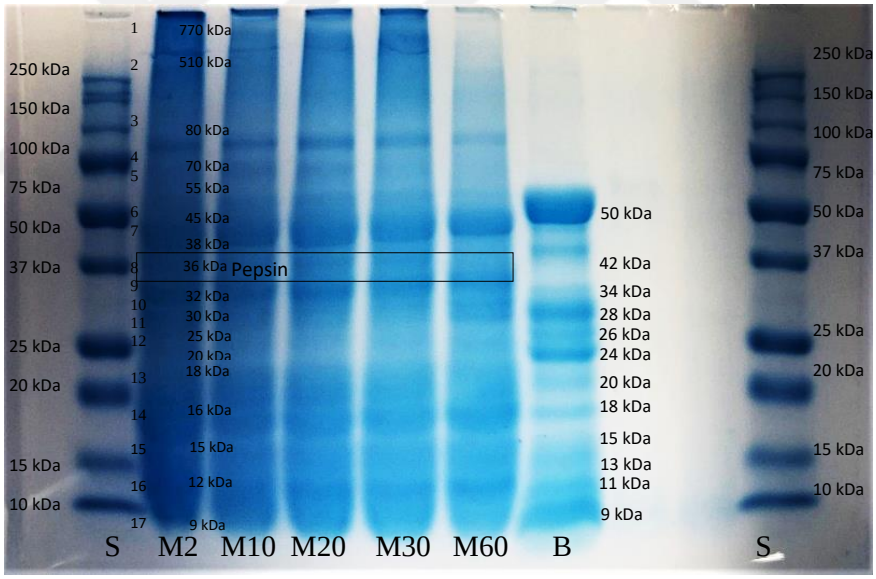
Tüm örneklerde mide sindiriminin ilk 2 dakikasında M_A>45 kDa olan protein bantlarının net olarak görülmediği (bantların yoğunluğunun çok düşük olduğu) belirlenmiştir (Şekil 11-13).

Un halindeki mercimek için açlık durumundaki *in vitro* mide sindiriminden 5 farklı sürede alınan örnekler için saptanan protein moleküler ağırlıkları 45 kDa, 10-15 kDa aralığında ve 10 kDa altında olmuştur. Ancak yine de 37-45 kDa arasında M_A'ya sahip proteinlerin varlığı söz konusudur. Bu proteinlerin vicilin (7S, 13.8-92.26 kDa) depo proteinleri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca daha önce vicilin depo proteinlerinde 47 kDa'a karşılık gelen alerjen bir protein bildirilmiştir (Akkardeas et al., 2012). Çalışmamızda her 3 örneğin ince bağırsak sindiriminde görünen 45 kDa M_A'ya sahip proteinin bu protein olacağı düşünülmektedir. Mercimek ununda ve pişmiş mercimekte bu protein kalmıştır. Dolayısıyla bu proteinin alerjen protein olabileceği düşünülmüştür. Bağırsak sindiriminde proteoliz devam etmiştir ve 50 kDa altında (45 kDa, 34 kDa, 28 kDa, 20 kDa, 11 kDa ve 9 kDa) proteinlerin varlığı belirlenmiştir (Şekil 11,12,13). *İn vitro* mide sindiriminde 28 kDa ve 20 kDa bantlarının görülmemiş olmasının ya SDS-Page'e uygulanan mide sindirimi örneklerindeki protein konsantrasyonunun yeterli

olmamasından ya da mide sindirim örneğinde 75 kDa civarında silik olarak izlenen proteinin ince bağırsaktaki hidrolizinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

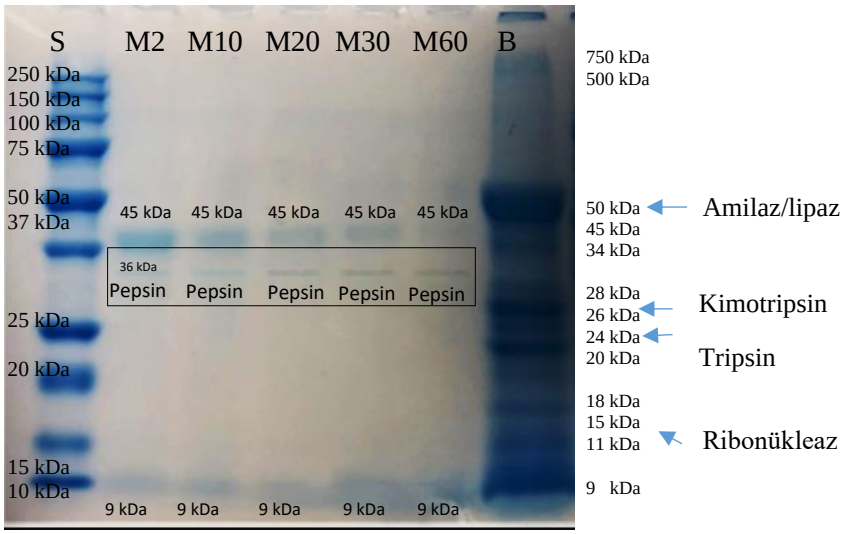
Mercimek protein izolatı sindirim örneklerinde midede M_A<36 kDa olan bantların olduğu ancak bunların birbirinden belirgin olarak ayrılmadığı görülmektedir. Protein izolatının sindirim profilinde 45 kDa bantının saptanmaması izolatın enzimlerin etkisine daha açık olduğunu ve bu proteinin enzimler tarafından hidrolizinde gıda matriksinin olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 13). İzolatın ince bağırsak sindiriminde pankreatin yerine kimotripsin ve tripsin enzimleri kullanılmışır. Dolayısıyla diğer örneklerdeki 50 kDa civarında izlenen bantlar görülmemektedir. Açlık sindiriminde izolatın ince bağırsak sindirimi 10-15 kDa (11 kDa, 13 kDa ve 15 kDa) arasında protein bantları saptanmıştır.

4.3.2. Tokluk *in vitro* sindirim modeli



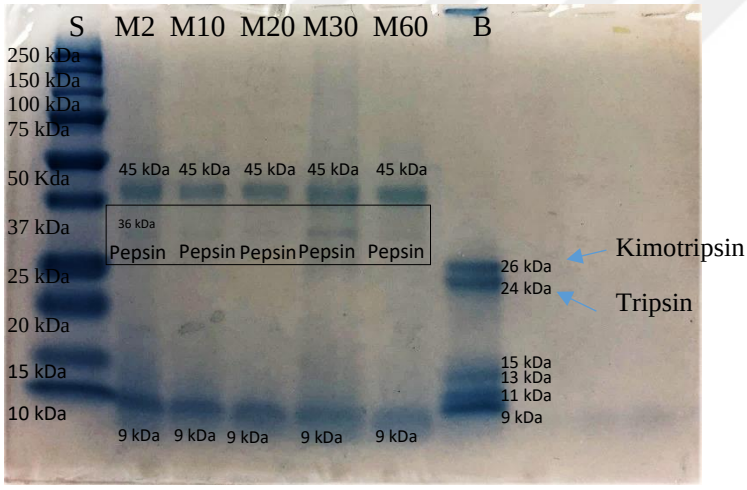
Şekil 14 Mercimek unu için tokluk durumunda sindirim

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 15 Pişmiş mercimek için tokluk durumunda sindirim

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 16 Mercimek protein izolatı için tokluk durumunda sindirim

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*

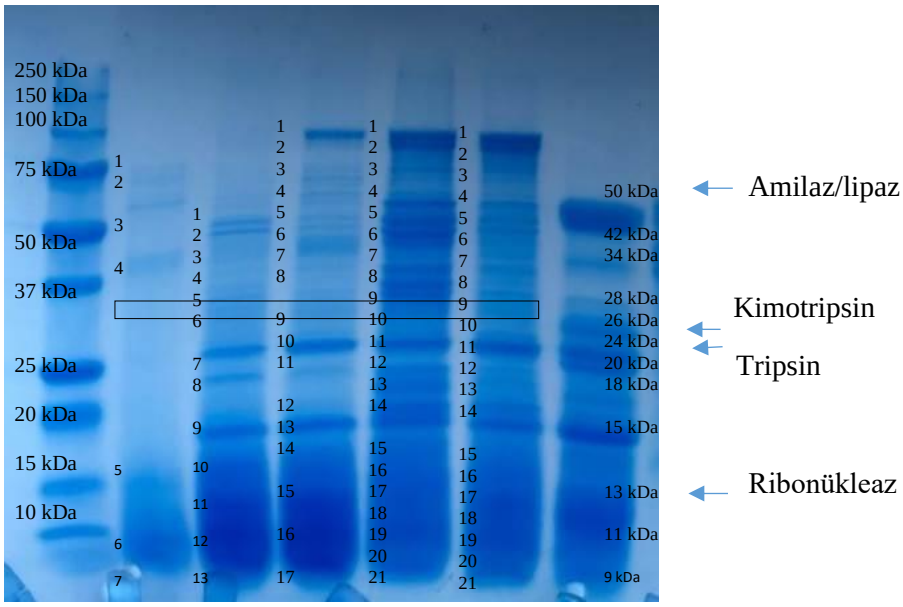
Mercimek ununun tokluk durumundaki mide sindirim örnekleri geniş aralıkta protein profili göstermiştir. Şekil 14 'te görüldüğü gibi mide örneklerinde 250 kDa üstü, 75-100 kDa, 30-50 kDa, 10-25 kDa arasında yoğunlaşma görülmüştür. Bu durum mide sindiriminde hemen hemen tüm proteinlerin

hidrolizinin gerçekleşmediği ya da çok sınırlı olduğunu göstermektedir. Bunun gıda matriksinin etkisi nedeniyle olabileceğini protein izolatının tokluk durumundaki mide sindirimi sonuçları da doğrulamaktadır. İzolatta M_A>45 kDa olan protein bantlarının olmaması bu proteinlerin pepsin enzimi ile hidrolize olduğunu göstermektedir. Ayrıca pişmiş mercimek ile kıyaslandığında ısıl işlemin de midedeki sindirimi olumlu etkilediği görülmektedir. Mide sindirimini takiben ince bağırsak sindiriminde saptanan 50 kDa ve altındaki protein bantlarının yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin hidrolizi ile oluştuğu düşünülmektedir. Un ve pişmiş mercimek için açlık durumu ince bağırsak sindiriminde 10 tane protein bandı (sindirim enzimleri dışında 6 protein bandı), tokluk durumu ince bağırsak sindiriminde ise 12 protein bandı (sindirim enzimleri dışında 8 protein bandı) saptanmıştır. Açlık sindiriminde midedeki düşük pH etkisi nedeniyle proteinlerin agrege olabileceği ve dolayısıyla ince bağırsaktaki proteolizin sınırlandığı düşünülmüştür. Hidrojen iyonları konsantrasyonunun protein stabilitesi üzerindeki rolü, asidik/bazik açılma ve proteinin pH'a bağlı stabilitesi ile açıklanabilmektedir. pH'daki değişikliklerin amiloid liflerinin oluşumunu ve agregasyonu tetiklediği gösterilmiştir (Talley and Aexov, 2010). Pişmiş mercimeğin tokluk durumundaki sindiriminde ise, ısıl işlemin etkisi nedeniyle mercimek unundaki bazı bantların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 15). Ancak pişmiş mercimeğin ince bağırsak sindiriminde M_A 250 kDa üstünde protein bantlarının görülmesi daha yüksek molekül ağırlıklı 11S ve 7S globülin alt birimlerine karşılık gelen proteinlerin ısıl işlem etkisi ile parçalandığının göstergesi olabilir (Barbana et al., 2013).

Mercimek proteini izolatının tokluk mide sindiriminde 37-50 kDa ve 10 kDa'da protein bantlarının varlığı saptanmıştır (Şekil 16). Açlık durumu izolat örneklerinde görülmeyen M_A 37-50 kDa arasındaki proteinlerin tokluk sindiriminde görülmemesi tokluk sindirimindeki pH'nın açlık ortamındaki pH'dan daha yüksek olmasına bağlı daha düşük proteoliz aktivitesinden kaynaklanabilir. İnce bağırsak sindiriminde devam eden proteoliz sonrasında 9 kDa, 11 kDa ve15 kDa M_A'lı protein bantları tespit edilmiştir. Un ve pişmiş mercimeğe göre daha küçük M_A ya sahip proteinler görülmektedir. Ayrıca protein profili açlık durumu ince bağırsak sindirimindeki protein profili ile benzerdir.

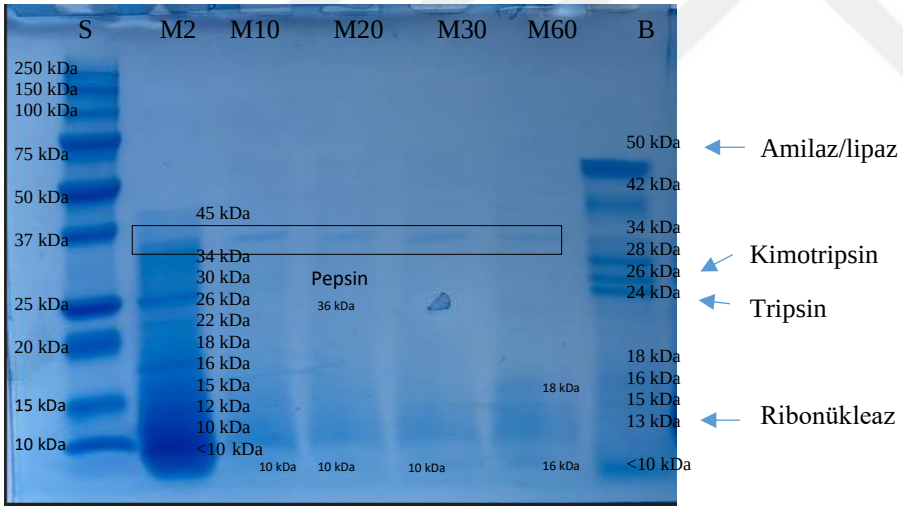
4.3.3. Bebek *in vitro* sindirim modeli

S M2 M10 M20 M30 M60 B



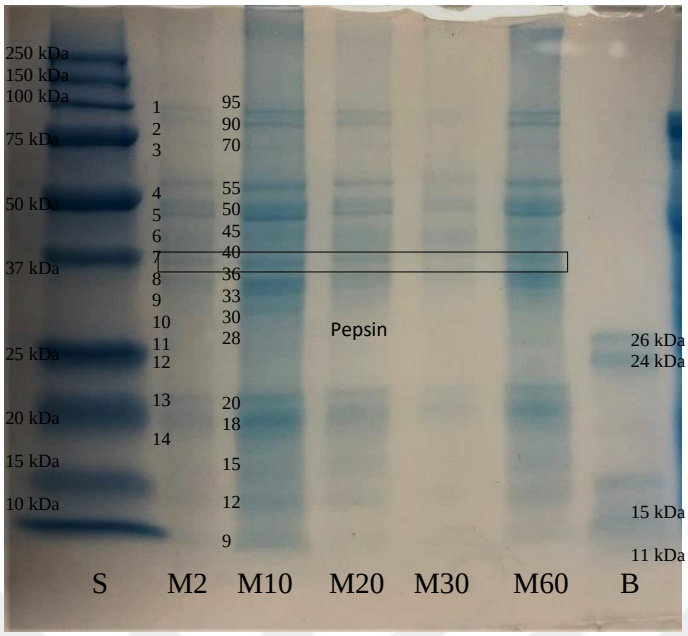
Şekil 17 Mercimek unu için bebek sindirimi

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 18 Pişmiş mercimek için bebek sindirimi

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**: Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*



Şekil 19 Mercimek protein izolatı için bebek sindirimi

***S**: Standart, **M2**: Mide 2.dakika, **M10**: Mide 10.dakika, **M20**: Mide 20.dakika, **M30**:Mide 30.dakika, **M60**: Mide 60.dakika, **B**: Bağırsak*

Bebek sindirimine uğrayan un halindeki mercimeğin SDS-Page görüntüsü proteolizin etkin gerçekleşmediğini göstermektedir (Şekil 17). Bebek mide sindirimindeki yüksek pH (mide pH 5.3) ve düşük enzim aktivitesi proteolizin etkinliğini düşüren etkenlerdendir. Isıl işlemin proteinlerin bebek sindirim koşullarındaki hidrolizini olumlu etkilediği Şekil 17'deki protein bantlarının düşük moleküler ağırlıklarda görülmesi desteklemektedir. Pişmiş mercimeğin mide sindiriminin 2. dakikasında görülen protein bantları mide sindirimi sonuna doğru kaybolmuştur. Matris etkisini gösteren mercimek unu mide sindirimi ile protein izolatı mide sindirimlerindeki protein bantları incelendiğinde mercimek ununda 21 protein bandı (pepsin enzimi bandı dahil) protein izolatında ise 17 protein bandı (pepsin enzimi bandı dahil) tespit edilmiştir. Mercimek ununda sindirime uğramadan önce 19 protein bandı, protein izolatında ise 25 protein bandı saptandığı (Tablo 7) göz önüne alındığında protein izolatındaki protein hidrolizinin, una göre daha etkin olduğunu söylemek mümkündür. Mide sindirimini takiben gerçekleşen ince bağırsak sindiriminde proteolizin devam ettiği (sindirim enzimleri hariç unda 8 protein bandı, izolatta 2 protein bandı) ancak proteinlerin tamamının hidrolize

olmadığı belirlenmiştir. Önemli bulgu ise 42 kDa MA'lı proteinin ve M_A<40 kDa proteinlerin *in vitro* Gİ sindirim sonunda hidrolize olmamasıdır (Şekil 17, 18).

Literatür incelendiğinde ise sonuçlar benzer görüntüler ile desteklenmektedir. Aryee and Boye, (2016) mercimek proteinleri mide-bağırsak sindirimini simüle etmek için pepsin ve tripsin/a-kimotripsin ile sindirime tabi tutulduktan sonra sindirilirliği SDS-Page analizi ile araştırmışlardır. Polipeptitlerin çoğu, peptik sindirimin ilk on dakikasından sonra hidrolize olmuştur. Peptik sindirimden ve triptik ve kimotriptik sindirimin ilk on dakikasından sonra 67 kDa'ya (7S globulinler) karşılık gelen bazı yoğun yüksek moleküler kütleli polipeptidlerin hidrolize olmamasına rağmen, sindirimin sonunda gözlenen ana bantlar 30 kDa'nın altında bulunmuştur. Böylece çalışmamızda da olduğu gibi un formundaki proteinler daha az hidrolize olmuş ve yüksek moleküler ağırlığa sahip protein bantları (özellikle 7S-globulinler) sindirime karşı dirençli olduğu yorumu yapılmıştır. Buna karşılık, protein konsantrelerindeki 7S globulinleri, bağırsak sindirim aşamasının başlangıcında çok hızlı bir şekilde tamamen hidrolize olmuştur. Un formunda mercimek proteinlerinin sindirilmesine karşı direnç, undaki proteinlerin matris etkisinden ve daha önce belirtildiği gibi hidrolize karşı bir bariyer oluşturmuş olabilecek protein olmayan bileşiklerin varlığından kaynaklanabilmektedir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde mercimek proteinlerinin SDS-Page görüntülerinde molekül ağırlıkları 15 ila 97 kDa arasında değişen çok sayıda protein bandı belirlenmiştir. Merkaptoetanol varlığında sırasıyla 11S globulinin bazik ve asidik alt birimlerine karşılık gelen 25 ve 43 kDa aralığında ana bantlar açığa çıkmıştır. Dahası, mercimek proteini izolatı için gözlemlenen en yoğun bantlardan ikisi, sırasıyla vicilin (48 kDa) ve convicilin'i (63 kDa) temsil eden 50 ve 65 kDa'lık bantlar olmuştur (Barbana et al., 2013). Bu bant aralığı çalışmamızdaki protein izolat örneklerinde de tespit edilmiştir. Albümin polipeptitleri, gama-vicilin ve/veya depolama proteinlerinin translasyon sonrası bölünmesinden gelen polipeptitlerin bir karışımı olan 20 kDa'nın altındaki düşük moleküler ağırlıklı bantların da gözlendiği bildirilmiştir (Shewry et al., 2004).

Ayrıca globulinlerin mercimekteki ana proteinler olduğu ve mercimekteki toplam çözünen proteinlerin %53.90'ını temsil ettiği rapor edilmiştir (Neves and Lourenço, 1995). Baklagil globülinlerinin mide sindirimine dirençli olduğu, ancak ince bağırsak sindiriminde peptitlere ve amino asitlere hidrolize oldukları bildirilmiştir. Tüm durumlarda, mide sindirimi sonunda büyük MA'lı peptitler proteinler (6-20 kDa) tespit edilmiştir (Hernandez et al., 2020). Alkali ekstraksiyonu ve ardından izoelektrik çöktürme genellikle globulin fraksiyonu açısından zengin protein izolatları üretilmesine neden olmuştur (S´anchez-Vioque et al., 1999). Çalışmada elde edttiğimiz sonuçlar, mercimek proteinleri için SDS-Page ile protein alt birimlerinin rapor edildiği daha önceki çalışmalarla uyumludur.

Tablo 8 Sindirilmemiş ve sindirilmiş örneklerin bant yoğunlukları

İn vitro sindirime uğramış örnekler									
Sindirim Süresi	AUN	APM	Aİ	TUN	TPM	Tİ	BUN	BPM	Bİ
Mide 2.dakika	0,1432	0,1452	0,1452	0,6085	0,1204	0,3326	0,3877	0,2149	0,1453
Mide 10.dakika	0,1354	0,1317	0,1545	0,4930	0,1312	0,3098	0,3260	0,2623	0,1445
Mide 20.dakika	0,1324	0,1302	0,1548	0,3991	0,1482	0,2954	0,3098	0,2643	0,1662
Mide 30.dakika	0,1334	0,1322	0,1546	0,3358	0,1743	0,3005	0,2584	0,2598	0,1768
Mide 60.dakika	0,1669	0,1390	0,1571	0,2729	0,2170	0,2755	0,2722	0,2453	0,1596
Bağırsak	0,2660	0,2568	0,1743	0,2015	0,5114	0,3666	0,2795	0,2073	0,1722
Sindirilmemiş örnekler									
UN	2,4080								
PM	1,9512								
İ	2,5296								

AUN: Açlık durumunda mercimek unu sindirimi; TUN: Tokluk durumunda mercimek unu sindirimi; BUN: Bebek sindirim koşullarında mercimek unu sindirimi; APM: Açlık durumunda pişmiş mercimek sindirimi; TPM: Tokluk durumunda pişmiş mercimek sindirimi; BPM: Bebek sindirimi koşullarında pişmiş mercimek sindirimi; Aİ: Açlık durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Tİ: Tokluk durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Bİ: Bebek sindirimi koşullarında mercimek protein izolatı sindirimi

Tablo 8'de örneklerin bant yoğunlukları verilmiştir. Açlık koşulundaki mide sindiriminde bant yoğunluğu mide sindirimi boyunca artış göstermiştir. Bu durum protein hidrolizinin mide sindirimi boyunca gerçekleştiğinin göstergesidir. Benzer olarak açlık koşulundaki ince bağırsak sindiriminde bant yoğunluğundaki artış devam etmiştir. Tokluk durumunda ise mercimek unu mide sindirimi başlangıcında fazla protein bandı gösterdiğinden yoğunluk yüksek çıkmıştır. Mide sindirimi boyunca ve ince bağırsak sindirimi sonunda proteinler parçalanmış ve dolayısıyla

bant yoğunluğu azalmıştır. Pişmiş mercimek örneğinde ise proteoliz mide sindirimi boyunca devam etmiş ve bant yoğunluğu artmıştır. Aynı şekilde proteoliz bağırsak sindirimi boyunca da devam etmiştir. Mercimek protein izolatı örneklerinde ise hem mide hem de ince bağırsak sindiriminde bant yoğunluklarının yüksek olduğu görülmektedir. Mercimek ununda bebek mide sindirimi koşullarında bant yoğunluğunun başlangıçta yüksek olduğu ve mide sindirimi sonuna doğru azaldığı belirlenmiştir. Pepsin enzimi etkisinin mide sindirmi sonuna doğru arttığı yoğunluğun azalmasından anlaşılmaktadır. Pişmiş mercimek ve izolat örnekleri için ise proteoliz mide sindirim boyunca devam etmiştir. Bebek bağırsak sindirimi sonuçları beklenen yoğunluğu göstermiştir.

4.4. Protein Sekansları LC/Q-TOF/MS Analizi

Tüm örneklerde ince bağırsak sindirimi sonunda 5 kDa altında kalan fraksiyonda gerçekleştirilen LC/Q-TOF/MS analizinde pik veren peptitler tanımlanmıştır. UniProtKB veritabanında seçilmiş dokuz protein, *in vitro* sindirimde kullanılan enzimler seçilerek MS-Digest programı tarafından parçalanmıştır. Program tarafından açığa çıkan peptitler örneklerde bulunan analiz ile tanımlanmış peptitlerle eşleştirilmiştir ve onlara ait sekans bilgileri Tablo 9'da gösterilmiştir. Seçilmiş bu dokuz protein için ince bağırsak sindiriminden sonra örneklerin peptit sayıları belirlenmiştir. Tokluk durumu mercimek proteini izolatı için 62 tane, un için 49 tane ve pişmiş mercimek için 41 tane olduğu belirlenmiştir. Açlık durumu mercimek proteini izolatı için ise 51 tane, un için 28 tane ve pişmiş mercimek için de 29 tane belirlenmiştir. Bebek sindirimi incelendiğinde un, pişmiş mercimek ve izolat için sırasıyla, 33, 28 ve 21 tane peptit olduğu görülmektedir. En fazla peptit sayısının tokluk durumunda sindirime uğrayan örneklerde olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak özellikle mide pH 'sının bu proteinlerin parçalanması için optimuma yakın değerde olması söylenebilir. Ayrıca sindirim sıvısının örneğe oranının açlık durumu sindirimine göre daha yüksek, bebek sindirimine göre ise daha düşük olması, enzim-substrat ilişkisinin verimi ve proteinlerin pH koşullarındaki agregasyonu açısından önemlidir.

Tablo 9'da yer alan A0AT28, A0AT29, A0AT30 ve A0AT33 kodlu proteinler spesifik olmayan lipid transfer proteinleridir. Bu proteinlerin hidrolizi ile

açığa çıkan peptitler, mercimek proteini izolatı için açlık ve tokluk sindirimi sonrasında en fazla saptanan peptitler olmasına rağmen, bebek sindirimi koşullarında en az sayıda saptanmıştır. Spesifik olmayan lipid transfer proteinler (nsLTP), farklı lipid moleküllerini transfer edebilen tünel benzeri bir hidrofobik boşluğa sahip olmaları ile karakterize edilen bitkilerde bulunan çok genli bir protein ailesidir. Son çalışmalar, nsLTP'lerin hem biyotik hem de abiyotik streste önemli işlevlerde rol aldığını göstermiştir (Garcia et al., 2021). nsLTP'ler baklagillerde, yer fıstığında ve kabuklu yemişlerde ve meyvelerde bulunan alerjen olarak tanımlanmıştır. nsLTP'ler kompakt proteinlerdir ve üçüncül yapıları, proteolitik koşullar altında bile stabil 4 korunmuş disülfid bağı ile korunmaktadır. Enzim aktivitesinin en düşük olduğu bebek sindiriminde bu proteinlerin parçalanma ürünlerinin (peptitlerin) en az saptanması bu nedenle olabilir. nsLTP'ler, moleküler ağırlıkları 6.5 ile 10.5 kDa arasında değişen ve izoelektrik noktaları (pI) 8.5 ila 12 arasında değişen proteinlerdir (Sun et al., 2008; Pii et al., 2009). Bu bilgiler SDS-Page görüntüleri ile de paralellik göstermektedir. Ayrıca, bu proteinlerin izolat elde etme işleminde pH 9'da proteinlerin çözündürülme aşamasında açığa çıktığı söylenebilir. Ek olarak düşük moleküler ağırlıkta olmaları, nsLTP'lerin, ciddi sistemik reaksiyonları başlatabilecekleri, tamamen alerjen bileşikler olarak Gİ sistemin merkezi kısımlarına ulaşmalarını kolaylaştırdıkları ve bu nsLTP alerjenlerinin ısısal işleme ve sindirime karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Fang et al., 2020).

P02870 ve Q93WH6 kodlu iki protein lektin olarak tanımlanmıştır. Tokluk ve bebek sindirimi sonuçları incelendiğinde bu proteinin pişmiş mercimekte una göre ~ %40 düzeyinde azalmasının ısıl işlemin olumlu bir etkisi olduğu söylenebilir. Mercimekte bulunan toplam proteinin %2.5'u lektinden oluşmaktadır. Bu lektinler, dimerin her iki ucunda yer alan iki karbonhidrat bağlama yerine sahip bir homodimerde kovalent olmayan bağlarla ilişkili, kanonik bir β-tabaka yapıya sahip iki protomerden oluşmaktadır. Şu anda, sınırlı sayıda yüksek bitki lektinleri, Uluslararası İmmünolojik Dernekler Birliği (WHO/IUIS) tarafından açık bir şekilde potansiyel alerjenler olarak kabul edilmiştir. WHO/IUIS Alerjen Adlandırma Alt Komitesi tarafından potansiyel gıda alerjenleri olarak atanan lektinlerin listesinde mercimek için (lens culinaris) LcA (legume lectin) alerjeni yer almaktadır. Lektin alerjenlerinin bu resmi listesine ek olarak, diğer bitki lektinleri,

IgE'yi bağlama, mast hücrelerini ve bazofilleri degranüle etme ve çeşitli alerjik hastalarda interlökin yanıtlarını tetikleme yeteneklerinin ardından potansiyel gıda alerjenleri olarak tanımlanmıştır (Barre et al., 2020). LC/Q-TOF/MS analizine göre en düşük 0.8 kDa ve en yüksek 1,22 kDa arasında bu peptitlere rastlanılmıştır (Tablo 9).

Biyotik stres, böcekler ve mikrobiyal patojenler gibi zararlıların istilasını önleyen fenolik bileşiklerin ve patogenez ile ilgili (PR) proteinlerin oluşumunu ve birikimini indükler. Bitki PR proteinlerinin çoğu asitte çözünür, düşük moleküler ağırlıklı ve proteaz enzim inhibitörleridir. BBI'ler düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir (~9000 da), ısıya dayanıklı, çift başlı ve iki serin proteazı tripsin ve kimotripsini bağımsız olarak veya aynı anda inhibe etme yeteneğine sahiptir (Herwade et al., 2021). Q8W4Y8 kodlu protein Bowman-Birk tipi proteinaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Tüm sindirim protokolleri için tüm örneklerde gözlemlenmiştir. Aralarında büyük bir fark olmaması ile birlikte bebek sindiriminde, tokluk sindirimine göre; tokluk sindiriminde açlık sindirimine göre daha az gözlenmiştir. Asit özellikli ortamlarda çözünürlüğünün yüksek olması bu peptitlerin açlık sindiriminde daha fazla açığa çıkması ile sonuçlanmış olabilir. Ek olarak, tüm örneklerde bu proteinin parçalanma ürünlerinin (peptitlerin) az miktarda bulunması, bu proteinin proteolize direnç gösterdiğinin kanıtı olabilir.

P38414 koduna ait protein Linoleat 9S-lipoksigenaz olarak tanımlanmıştır. Bitki lipoksigenazları (LOX'lar), büyüme, yaşlanma ve stresle ilgili tepkiler gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan fonksiyonel olarak çeşitli bir dioksigenaz sınıfıdır (Rameshwari et al., 2015). Lipoksigenaz, doğada yaygın olarak bulunan ve baklagil ile diğer bitki hücrelerinde bol miktarda bulunan, oksidatif reaksiyonları katalize eden, 90-110 kDa moleküler ağırlığa sahip tek zincirli bir monomer enzimdir. Oksidasyon sırasında üretilen aroma bileşikleri gıdanın lezzetini ya arzu edilen ya da istenmeyen bir şekilde etkiler (Song et al., 2016). Mercimek fidelerinden kısmen saflaştırılmış LOX izoenzimleri, pH 6.0 ve 6.5 civarında optimum değeri göstermiştir (Hilbers et al., 1995). Çalışmamızda tüm örneklerde olmakla birlikte *in vitro* tokluk sindiriminde en fazla, *in vitro* bebek sindirimde ise en az düzeyde saptanmıştır.

B3F051 koduna ait protein defensin Lc-def olarak tanımlanmıştır. Bitki defensinleri, zararlılara ve patojenlere karşı bitki savunmasında yer alan ve stres koşulları altında bitki dokularında biriken, patogenezle ilgili proteinlerin (PRP) geniş bir ailesine aittir. Defensinler, bakteri, mantar ve virüsler dahil olmak üzere farklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip temel proteinlerdir. Doğuştan gelen bağışıklık yanıtının gelişimine katkı sağlarlar. Bitki defensinleri küçük (45-54 amino asit kalıntısı), bazik, sistein açısından zengin proteinlerdir. Bunların çoğu, çeşitli bitki dokularında eksprese edilmelerine rağmen tohumlarda karakterize edilmiştir. Bitki defensinlerinin amino asit dizileri, dört disülfid köprüsü oluşturan sekiz yapısal olarak önemli ve koruyucu sistein varlığı ile karakterize edilir. Tripsin veya kimotripsini inhibe etmezler. (Ekaterina et al., 2008; Shenkarev et al., 2014). Bu proteinin parçalanma ürünleri tüm sindirim protokollerinde tüm örneklerde belirlenmiştir, aralarında miktar olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

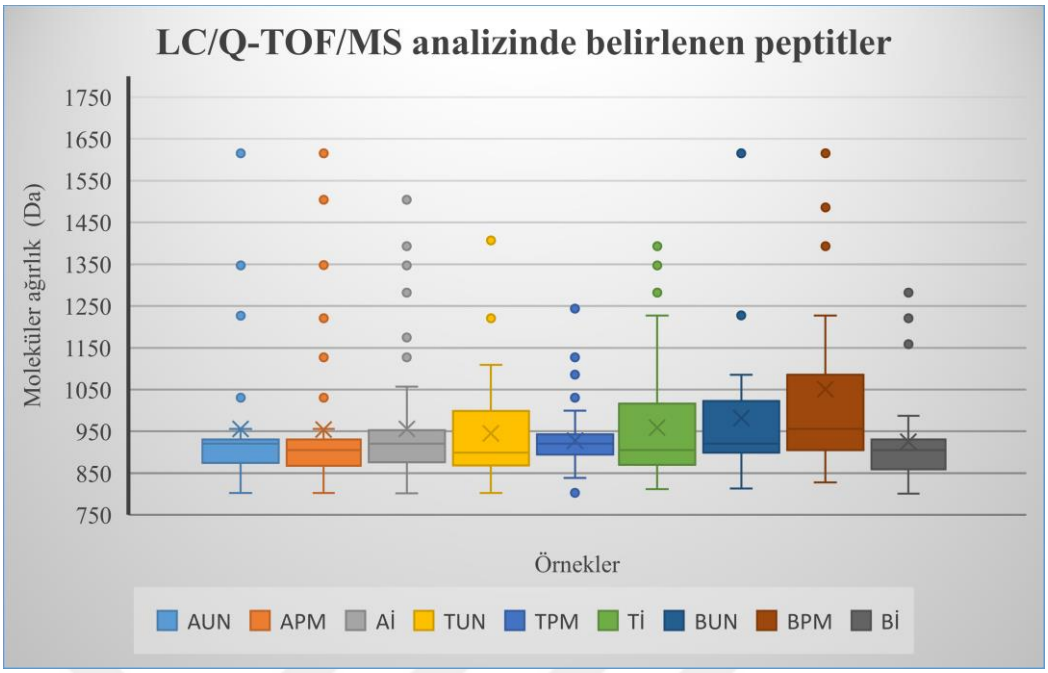
Mercimek proteinleri yaklaşık %16 albümin, %70 globulin, %11 glutelin ve %3 prolaminlerden oluşur (Boye et al., 2010). Albüminler, glutelinler ve prolaminler sırasıyla yaklaşık 20, 17-46 ve 16-64 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve sırasıyla her biri yaklaşık 13, 4 ve 10 polipeptitten oluşur (Jarpa-Parra, 2017). 2S albüminleri, başlıca hem monokotiledonlu hem de dikotiledonlu tohumlarda bulunan ve prolamin süper ailesine ait olan düşük moleküler ağırlıklı ve sistein bakımından zengin proteinlerdir. P86782 koduna ait protein Albumin-2 olarak tanımlanmıştır. Bu proteinler ısıya ve proteolize karşı stabildir (Gupta et al., 2008). Tüm örnekler arasında sadece açlık durumunda sindirilen mercimek proteini izolatında saptanmıştır.

Q8MCR6, maturaz K olarak tanımlanmıştır ve tüm örneklerde saptanmıştır. Maturase K (matK) bir bitki plastidial genidir. Kodladığı protein, Grup II intronlarını birbirine bağlayan bir protein olan organel intron maturazdır. Maturase K (matk) geni, genlerin hızlı bir şekilde evrimleşmesi, bir nükleotid ve buna karşılık gelen amino asit seviyeleri nedeniyle bitki moleküler sistematiğinde ve evriminde potansiyele sahip bir ilgi geni olarak ortaya çıkmıştır (Miller et al., 2006). Bu genlerden gelen tRNA veya protein ürünleri, fotosentez dahil olmak üzere normal kloroplast fonksiyonu için gereklidir, bu da matK'nın kloroplastta önemli bir

fonksiyona sahip olduğunu, önemli bir şekilde transkripsiyon sonrası bir ekleme faktörü olarak olduğunu gösterir (Michelle et al., 2007).

Açığa çıkan biyoaktif peptitlerde (QS), (GQ), (GK), (VG) sekansları dipeptidil peptidaz 4 inhibitör, (PIL), (NS), (TL) sekansları ace inhibitör peptit, (PVL) sekansı ADE inhibitör ve antioksidan ve (IR), (DI), (VN) sekansları ise bu üç biyoaktif özelliği (dipeptil peptidaz 4 inhibitör, ADE inhibitör ve antioksidan) göstermiştir (García-Mora et al., 2016). Bu sekanslar çalışmamızdaki tüm örneklerde saptanmıştır.

Şekil 20'de LC/Q-TOF/MS analizinde belirlenen peptitlerin moleküler ağırlık dağılımı görülmektedir. Görüldüğü gibi bebek sindiriminde un ve pişmiş mercimeğin ortalama moleküler ağırlık dağılımı yüksektir. Sindirim sırasında hidrolizin etkin gerçekleşmediği söylenebilir. Buna karşılık bebek sindirimi izolat örneğinde küçük moleküler ağırlık dağılımı görülmektedir. Diğer örnekler arasında tokluk durumu pişmiş mercimek örneğinin M_A dağılımı daha az olmuştur. Sindirim sırasında hidroliz etkin gerçekleşmiş ve proteinler hidroliz olmuştur. Benzer çalışmada (Torcello Gomez et al., 2020), bebek sindirim modeli bağırsak sindiriminde açığa çıkan peptitlerin diğer iki sindirim modeline göre daha büyük moleküler ağırlığa sahip oldukları saptanmıştır. Tokluk ve açlık yetişkin sindiriminde peptitlerin medyan M_A değerleri genel olarak tokluk sindiriminde biraz daha düşüktür.



Şekil 20 LC/Q-TOF/MS analizinde belirlenen peptitlerin moleküler ağırlıklarına göre dağılımı

AUN: Açlık durumunda mercimek unu sindirimi; TUN: Tokluk durumunda mercimek unu sindirimi; BUN: Bebek sindirim koşullarında mercimek unu sindirimi; APM: Açlık durumunda pişmiş mercimek sindirimi; TPM: Tokluk durumunda pişmiş mercimek sindirimi; BPM: Bebek sindirimi koşullarında pişmiş mercimek sindirimi; Aİ: Açlık durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Tİ: Tokluk durumunda mercimek protein izolatı sindirimi; Bİ: Bebek sindirimi koşullarında mercimek protein izolatı sindirimi

Tablo 9 LC/Q-TOF/MS analizinde belirlenen peptitler

Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Açlık durumunda un sindirimi				
A0AT33 / Pepsin	898,6321	5	12	(L)VMCMVVIA(P)
A0AT30 / Pepsin	898,6307	13	20	(L)VMCMVVIA(P)
	898,628			
Q8MCR6 / Tripsin	898,6307	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin	930,6223	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
Q8MCR6 / Pepsin		322	329	(I)NPLSEHSF(K)
P49252 / Tripsin	930,622	204	210	(K)IVEYHDR(D)
Q8MCR6 / Pepsin	802,537	137	142	(L)EDKFTY(L)
P38414 / Pepsin		419	427	(L)GGVTVEGAI(Q)
Q8MCR6 /	802,537	137	142	(L)EDKFTY(L)
Kimotripsin	802,537	440	446	(K)TLACKHK(S)
Q8MCR6 / Tripsin				

P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin P38414 / Kimotripsin P49252 / Tripsin Q8W4Y8 / Tripsin	1030,5824 1030,5824 1030,583 1030,583	546 443 546 486 102	554 451 554 495 110	(L)SVVHPIHKL(L) (A)CKHKSTVRA(F) (L)SVVHPIHKL(L) (K)TVRIVDGGSK(R) (K)ACHNSEIEE(-)
Q8MCR6 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	955,4881	225 108	232 116	(F)LRNQSSHL(P) (I)STTTNCNTI(K)
B3F051 / Pepsin A0AT29 / Tripsin A0AT31 / Tripsin P38414 / Tripsin	894,5946 894,5946 894,5961 894,5961	1 1 91 1	8 8 98 8	(-)MEKKTVAA(L) (K)LTQRNNDESLR(N) (K)CGVNIPYK(I) (-)MASLLFGR(G)
B3F051 / Pepsin	920,6104 920,7416 920,74 920,7366 920,7409 920,743	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	920,6104 920,7416 920,74 920,7366 920,7409 920,743 920,7416	390 447	397 454	(L)SFPIKSKL(D) (K)STVRAFLK(R)
P02870 / Pepsin A0AT31 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	822,3654	264 27 264	272 35 272	(L)GGTSSSKQA(A) (I)SCGAVTGDL(S) (L)GGTSSSKQA(A)
A0AT31 / Pepsin P49252 / Pepsin Q8MCR6 / Kimotripsin	828,566 828,566	72 92 158	79 98 164	(A)ACNCMKSA(A) (I)NSQTHEI(L) (L)EILVQIL(R)
P49252 / Kimotripsin A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	1346,8736 1346,8736 1346,8736	824 824 824	834 834 834	(K)LTQRNNDESLR(N) (K)LTQRNNDESLR(N) (K)LTQRNNDESLR(N)
P38414 / Kimotripsin	838,5576	751	757	(Y)DDLAKNY(E)
P38414 / Kimotripsin A0AT31 / Tripsin	867,7004 867,7004	176 70	184 77	(Y)LPSATPAPL(V) (R)QAACNCMK(S)
Q8MCR6 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	806,5676 806,5676	428 429	433 434	(Y)RIKYIL(R) (R)IKYILR(L)
A0AT30 / Tripsin	1226,2936	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	1615,016	70	85	(R)QAACNCMKSAASSITK(L)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Açlık durumunda pişmiş mercimek sindirimi				
A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	898,6306 898,6284 898,6316	5 13	12 20	(L)VMCMVVIA(P) (L)VMCMVVIA(P)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin P49252 / Tripsin	930,622 930,622	591 322 204	598 329 210	(A)MEMSAVVY(K) (I)NPLSEHSF(K) (K)IVEYHDR(D)
Q8MCR6 / Pepsin P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Kimotripsin P38414 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	802,5367 802,5367 802,5367 802,5367	137 419 137 859 440	142 427 142 866 446	(L)EDKFTY(L) (L)GGVTVEGAI(Q) (L)EDKFTY(L) (R)GIPNSISI(-) (K)TLACKHK(S)

P38414 / Pepsin	1030,583	546	554	(L)SVVHPIHKL(L)
Q8MCR6 / Pepsin		443	451	(A)CKHKSTVRA(F)
P38414 / Kimotripsin	1030,583	546	554	(L)SVVHPIHKL(L)
P49252 / Tripsin	1030,583	486	495	(K)TVRIVDGGSK(R)
Q8W4Y8 / Tripsin	1030,583	102	110	(K)ACHNSEIEE(-)
Q8MCR6 / Pepsin	955,4879	225	232	(F)LRNQSSHL(P)
A0AT30 / Pepsin		108	116	(I)STTTNCNTI(K)
B3F051 / Pepsin	894,5961	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT33 / Tripsin	894,5961	91	98	(K)CGVNIPYK(I)
P38414 / Tripsin	894,5961	1	8	(-)MASLLFGR(G)
P02870 / Pepsin	873,4968	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 / Pepsin		230	236	(L)KDVVPEW(V)
P38414 / Pepsin		326	333	(L)PTDVLSKI(S)
P02870 / Tripsin	873,4968	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
B3F051 / Pepsin	920,6115 920,741 920,7406 920,7427	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin	920,6115 920,741 920,7406 920,7427	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
Q8MCR6 / Tripsin	920,7406	447	454	(K)STVRAFLK(R)
A0AT31 / Pepsin	828,5672	72	79	(A)ACNCMKSA(A)
P49252 / Pepsin		92	98	(I)NSQTHEI(L)
Q8MCR6 / Kimotripsin	828,5672	158	164	(L)EILVQIL(R)
Q93WH6 / Pepsin P02870 / Pepsin	1220,3374			
P38414 / Pepsin	905,2509	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,2509	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT29 / Tripsin	905,2509	14	21	(K)GTVILMQK(N)
Q8W4Y8 / Tripsin	905,2509	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT30 / Pepsin	845,399	96	103	(L)PGKCNVNI(P)
Q8MCR6 / Tripsin	845,399	340	346	(R)LNRSVVR(S)
Q8W4Y8 / Pepsin	1347,8767	1	12	(-)MVLMNKKAIMKL(A)
A0AT29 / Tripsin	1347,8767	824	834	(K)LTQRNNDESLR(N)
P38414 / Tripsin	1347,8767	824	834	(K)LTQRNNDESLR(N)
P02870 / Pepsin	871,3245	5	11	(L)QTQMISF(Y)
P49252 / Pepsin		151	158	(I)SEIVCSSF(T)
Q93WH6 / Pepsin		5	11	(L)QTQMISF(Y)
Q93WH6 / Kimotripsin	871,3245	5 5	11 11	(L)QTQMISF(Y) (L)QTQMISF(Y)
P02870 / Kimotripsin P49252 / Tripsin	871,3245	603	609	(K)NREIVNK(D)
P38414 / Kimotripsin	867,699	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)
A0AT31 / Tripsin	867,699	70	77	(R)QAACNCMK(S)
Q8MCR6 / Kimotripsin	806,5677 806,5677	428 1	433 8	(Y)RIKYIL(R) (-)MASLLFGR(G)
A0AT29 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	806,5677	429	434	(R)IKYILR(L)
A0AT30 / Tripsin	1127,2938	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	1615,016	70	85	(R)QAACNCMKSAASSITK(L)
P02870 / Tripsin	817,5751	66	73	(K)AVKSTVGR(A)

Q8MCR6 / Tripsin	1503,9394	72	84	(K)YETSPTLISIPRK(I)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Açlık durumunda protein izolatı sindirimi				
A0AT33 / Pepsin	898,6328	5	12	(L)VMCMVVIA(P)
A0AT30 / Pepsin		13	20	(L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6328	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin	930,6256	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
Q8MCR6 / Pepsin		322	329	(I)NPLSEHSF(K)
P49252 / Tripsin	930,6256	204	210	(K)IVEYHDR(D)
Q8MCR6 / Pepsin	909,3914	1	8	(-)MKESQVYL(E)
P49252 / Kimotripsin	909,3914	358	365	(F)LENAICVF(E)
P86782 / Kimotripsin		10	17	(F)SVLNXEAY(L)
Q8MCR6 / Kimotripsin		1	8	(-)MKESQVYL(E)
P02870 / Pepsin	873,4968	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 / Pepsin		230	236	(L)KDVVPEW(V)
P38414 / Pepsin		326	333	(L)PTDVLSKI(S)
P02870 / Kimotripsin	873,4968	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 /		230	236	(L)KDVVPEW(V)
Kimotripsin	873,4968	325	332	(K)LPTDVLSK(I)
A0AT29 / Tripsin	873,4968	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
P02870 / Tripsin	873,4968	325	332	(K)LPTDVLSK(I)
P38414 / Tripsin	873,4968	603	609	(K)NREIVNK(D)
P49252 / Tripsin	873,4968	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
Q93WH6 / Tripsin				
Q8MCR6 / Pepsin	927,4175	1	7	(-)MKESQVY(L)
Q8MCR6 / Kimotripsin	927,4175	1	7	(-)MKESQVY(L)
B3F051 / Pepsin	920,6096	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
	920,7412			
	920,7397			
	920,7397			
	920,7411			
	920,7455			
	920,7402			
	920,743			
P38414 / Kimotripsin	920,6096	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
	920,7412			
	920,7397			
	920,7397			
	920,7411			
	920,7455			
	920,7402			
	920,743			
Q8MCR6 / Tripsin	920,7455	447	454	(K)STVRAFLK(R)
P38414 / Pepsin	825,4958	360	366	(I)QVDHSAW(M)
		680	687	(L)VEVGHGDL(K)
A0AT28 / Pepsin		12	18	(A)LMCMVVI(S)
		74	81	(A)CNCLKSSA(G)
P38414 / Kimotripsin	825,4958	680	687	(L)VEVGHGDL(K)
Q8MCR6 / Pepsin	847,4762	325	331	(L)SEHSFKL(L)
P02870 / Pepsin		84	91	(W)DRDTGNVA(N)
Q93WH6 / Pepsin		84	91	(W)DRDTGNVA(N)

P38414 / Kimotripsin	847,4762	266	272	(Y)LPRDEAF(G)
Q8MCR6 /		287	294	(L)ASKNAPFL(M)
Kimotripsin		287	294	(L)ASKNAPFL(M)
Q8MCR6 /	847,4762	447	454	(R)KINATATK(A)
Kimotripsin	847,4762	828	834	(R)NNDESLR(N)
P38414 / Tripsin				
P38414 / Pepsin	905,2503	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,2503	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT31 / Pepsin	895,4777	1	7	(-)MARSMKL(A)
A0AT31 /	895,4777	1	7	(-)MARSMKL(A)
Kimotripsin		164	170	(Y)QSDRIFF(A)
P38414 / Kimotripsin	895,4777	1	8	(-)MASLLFGR(G)
A0AT29 / Tripsin	895,4777	1	8	(-)MASLLFGR(G)
P38414 / Tripsin				
Q8W4Y8 / Pepsin	935,1828	1	8	(-)MVLMNKKA(I)
P38414 / Pepsin		560	567	(Y)RDTMNINA(L)
A0AT29 / Pepsin		32	40	(A)VTSDLSPCL(T)
A0AT33 / Pepsin		24	32	(A)VTSDLSPCL(T)
Q8MCR6 / Tripsin	935,1828	290	297	(K)NAPFLMDK(W)
A0AT30 / Pepsin	952,5997	27	36	(A)VSCGTVTGDL(A)
A0AT29 / Tripsin	952,5997	621	629	(K)DPSSPHGVR(L)
	952,5997	261	268	(R)SDTVYLPR(D)
P38414 / Tripsin	952,5997	621	629	(K)DPSSPHGVR(L)
Q8MCR6 / Pepsin	1056,5289	1	8	(-)MKESQVYL(E)
P49252 / Pepsin		240	249	(L)TSHQPQGPGF(Q)
Q8MCR6 /	1056,5289	1	8	(-)MKESQVYL(E)
Kimotripsin		240	249	(L)TSHQPQGPGF(Q)
P49252 / Kimotripsin	1056,5289	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
A0AT29 / Tripsin	1056,5289	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
P38414 / Tripsin				
A0AT30 / Pepsin	845,399	96	103	(L)PGKCNVNI(P)
Q8MCR6 / Tripsin	845,399	340	346	(R)LNRSVVR(S)
P38414 / Pepsin	926,1803	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin	926,1803	689	695	(K)SATWWFK(M)
P38414 / Tripsin	926,1803	689	695	(K)SATWWFK(M)
Q8MCR6 / Tripsin	926,1803	412	418	(R)NLSHYYK(G)
P49252 / Pepsin	1174,6495	598	606	(A)VWTKKNREI(V)
Q8MCR6 / Pepsin		478	487	(F)PRDSSTLERL(S)
A0AT31 / Pepsin	879,4419	1	7	(-)MARSMKL(A)
P49252 / Pepsin		569	575	(Y)NVWVTPY(N)
A0AT31 /	879,4419	1	7	(-)MARSMKL(A)
Kimotripsin		569	575	(Y)NVWVTPY(N)
P49252 / Kimotripsin	879,4419	71	78	(R)RAACNCLK(S)
A0AT28 / Tripsin	879,4419	1	7	(-)MVLMNKK(A)
Q8W4Y8 / Tripsin				
Q8W4Y8 / Pepsin	902,4698	101	108	(Y)KACHNSEI(E)
A0AT29 / Pepsin		65	72	(A)NTTPDRQA(A)
A0AT33 / Pepsin		1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
A0AT31 / Pepsin		64	71	(A)NTTPDRQA(A)
B3F051 / Kimotripsin	902,4698	1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
A0AT29 / Tripsin	902,4698	269	276	(R)DEAFGHVK(S)

P38414 / Tripsin	902,4698	269	276	(R)DEAFGHVK(S)
P49252 / Pepsin	1175,5829	480	489	(F)EKTSLKTVRI(V)
Q8W4Y8 / Tripsin	1175,5829	48	58	(K)SACCDTCLCTR(S)
P02870 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	801,4377	42 42	48 48	(F)SPDQKNL(I) (F)SPDQKNL(I)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	801,4762 801,4377	859 859	866 866	(R)NNDESLR(N) (R)GIPNSISI(-)
P02870 / Kimotripsin Q93WH6 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	801,4377 801,4377	42 42 440	48 48 446	(F)SPDQKNL(I) (F)SPDQKNL(I) (K)TLACKHK(S)
A0AT29 / Tripsin	801,4377	859	866	(R)GIPNSISI(-)
B3F051 / Pepsin	956,5567	59	66	(L)SGRCRDDF(R)
B3F051 / Kimotripsin	956,5567	59	66	(L)SGRCRDDF(R)
B3F051 / Pepsin	878,3777	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	1281,8079 1281,8079 1281,8079	448 448 1	459 459 10	(K)INATATKAYATR(T) (K)INATATKAYATR(T) (-)MKESQVYLER(A)
P38414 / Kimotripsin A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	890,4837 890,4837 890,4837 890,4837	638 14 14 122	645 21 21 127	(Y)ASDGLEIW(A) (K)GTVILMQK(N) (K)GTVILMQK(N) (K)YYKNFR(S)
Q8MCR6 / Kimotripsin	1051,5371	99	107	(F)SIVVEIPFF(L)
P49252 / Kimotripsin A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	1346,871 1346,871 1346,871	250 824 824	261 834 834	(F)QINGTSVSWANW(K) (K)LTQRNNDESLR(N) (K)LTQRNNDESLR(N)
A0AT30 / Tripsin	1127,2933	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	868,5025	70	77	(R)QAACNCMK(S)
P02870 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	817,5751 817,5751	66 66	73 73	(K)AVKSTVGR(A) (K)AVKSTVGR(A)
P02870 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	1015,555 1015,555	189 272	196 279	(R)QEELKTLR(G) (K)DPNIHYVR(Y)
P49252 / Tripsin	857,4611	228	235	(K)QSPPFGPK(Q)
P49252 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	1503,9423 1503,9426	54 362	66 374	(K)LAFHYIGVDDPEK(D) (K)KIDIIVPILPLIR(S)
Q8MCR6 / Tripsin	1392,8767	140	150	(K)FTYLNYVSDIR(I)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Tokluk durumunda un sindirimi				
A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	898,6337 898,6317 898,6286	5 13	12 20	(L)VMCMVVIA(P) (L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6331	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin	930,6229	591 322	598 329	(A)MEMSAVVY(K) (I)NPLSEHSF(K)
P49252 / Tripsin	931,6219	204	210	(K)IVEYHDR(D)
Q8MCR6 / Pepsin P38414 / Pepsin	802,5358	137 419	142 427	(L)EDKFTY(L) (L)GGVTVEGAI(Q)
Q8MCR6 / Kimotripsin	802,5358	137	142	(L)EDKFTY(L)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin	1030,5826	546 443	554 451	(L)SVVHPIHKL(L) (A)CKHKSTVRA(F)

P38414 / Kimotripsin	1030,5826	546	554	(L)SVVHPIHKL(L)
P49252 / Tripsin	1031,5828	486	895	(K)TVRIVDGGSK(R)
Q8W4Y8 / Tripsin	1031,5828	102	110	(K)ACHNSEIEE(-)
B3F051 / Pepsin	894,5953	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT29 / Tripsin	894,5933	1	8	(-)MASLLFGR(G)
A0AT31 / Tripsin	894,5951	98	105	(K)CGVNIPYK(I)
A0AT33 / Tripsin	894,5951	91	98	(K)CGVNIPYK(I)
P38414 / Tripsin	894,5933	1	8	(-)MASLLFGR(G)
B3F051 / Pepsin	920,6106 920,609 920,7417	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin	920,6106 920,609 920,7417	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
Q8MCR6 / Tripsin	921,7402	447	454	(K)STVRAFLK(R)
Q93WH6 / Pepsin	1220,3353	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P02870 / Pepsin	1220,3369	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P38414 / Pepsin	905,2518	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Pepsin	926,5858	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin	926,5858	689	695	(K)SATWWFK(M)
P38414 / Tripsin	926,5858	689	695	(K)SATWWFK(M)
P38414 / Pepsin	946,4973	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
Q8MCR6 / Pepsin	998,5934 998,5928	1	8	(-)MKESQVYL(E)
Q8MCR6 / Kimotripsin	998,5934 998,5928	1	8	(-)MKESQVYL(E)
Q8MCR6 / Pepsin	827,3806	42	48	(L)FVENVGY(D)
A0AT33 / Pepsin		5	11	(L)VMCMVVI(A)
A0AT30 / Pepsin		13	19	(L)VMCMVVI(A)
Q8MCR6 / Kimotripsin	827,3806	42	48	(L)FVENVGY(D)
P49252 / Pepsin	876,4207	105	112	(I)KSIVSDNI(H)
P49252 / Pepsin	876,5659	639	645	(F)ELRPTNF(F)
P38414 / Pepsin		273	280	(F)GHVKSSDF(L)
Q8MCR6 / Pepsin		410	416	(I)SRNLSHY(Y)
P49252 / Kimotripsin	876,4207	639	645	(F)ELRPTNF(F)
P38414 / Kimotripsin	876,5659	273	280	(F)GHVKSSDF(L)
A0AT29 / Pepsin	823,4146	1	7	(-)MARGMKL(A)
A0AT30 / Pepsin	823,3805	1	1	(-)MARSMNL(A)
B3F051 / Pepsin		1	7	(-)MEKKTVA(A)
A0AT30 / Kimotripsin	823,4146 823,3805	1 1	7 7	(-)MARSMNL(A) (-)MARGMKL(A)
A0AT29 / Kimotripsin		168	174	(W)VKDAPFF(H)
Q8MCR6 / Kimotripsin				
A0AT29 / Pepsin	852,3698	28	36	(I)SCGAVTSDL(S)
A0AT33 / Pepsin		20	28	(I)SCGAVTSDL(S)
A0AT29 / Tripsin	852,3698	317	324	(R)SLYDGGIK(L)
P38414 / Tripsin	852,3698	317	324	®SLYDGGIK(L)
P02870 / Kimotripsin	873,4968	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 / Kimotripsin	873,4968	230 325	236 332	(L)KDVVPEW(V) (K)LPTDVLSK(I)
A0AT29 / Tripsin	873,4968	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
P02870 / Tripsin	873,4968	325	332	(K)LPTDVLSK(I)

P38414 / Tripsin P49252 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	873,4968 873,4968	603 61	609 68	(K)NREIVNK(D) (K)LTLTKAVK(S)
P38414 / Kimotripsin A0AT29 / Tripsin	905,2518	1 14	7 21	(-)MVLMNKK(A) (K)GTVILMQK(N)
P38414 / Kimotripsin	838,5572	751	757	(Y)DDLAKNY(E)
P38414 / Kimotripsin	867,6992	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)
Q8MCR6 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	806,5675 806,5672 806,5672	428 429	433 434	(Y)RIKYIL(R) (R)IKYILR(L)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	1108,6131 1108,6131	746 746	755 755	(K)GTPEYDDLAK(N) (K)GTPEYDDLAK(N)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin 	1406,5597 1406,5597 1406,5597 1406,5597	616 197 616 197	629 208 629 208	(R)GVAVKDPSSPHGVR(L) (R)GDGTGERQEWDR(I) (R)GVAVKDPSSPHGVR(L) (R)GDGTGERQEWDR(I)
A0AT30 / Tripsin	1227,2962	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	868,7	70	77	®QAACNCMK(S)
P02870 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	817,575 817,575	66 66	73 73	(K)AVKSTVGR(A) (K)AVKSTVGR(A)
P02870 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	999,5928 999,5934	231 231	238 238	(K)DVVPEWVR(I) (K)DVVPEWVR(I)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Tokluk durumunda mercimek sindirimi				
A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	898,6331 898,631 898,6283	5 13	12 20	(L)VMCMVVIA(P) (L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6331	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin	930,6219	591 322	598 329	(A)MEMSAVVY(K) (I)NPLSEHSF(K)
P49252 / Tripsin	931,6219	204	210	(K)IVEYHDR(D)
Q8MCR6 / Pepsin P38414 / Pepsin	802,5361 802,5365	137 419	142 427	(L)EDKFTY(L) (L)GGVTVEGAI(Q)
Q8MCR6 / Kimotripsin	802,5361 802,5365	137	142	(L)EDKFTY(L)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin	1030,5828 1030,59	546 443	554 451	(L)SVVHPIHKL(L) (A)CKHKSTVRA(F)
P38414 / Kimotripsin P49252 / Tripsin Q8W4Y8 / Tripsin	1030,5828 1030,59 1031,5828 1031,5828	546 486 102	554 895 110	(L)SVVHPIHKL(L) (K)TVRIVDGGSK(R) (K)ACHNSEIEE(-)
B3F051 / Pepsin	894,5951 894,5953	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
B3F051 / Pepsin	920,61 920,6091 920,7431 920,7405 920,7402	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin	920,61 920,6091 920,7431 920,7405 920,7402	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
Q8MCR6 / Tripsin	921,7402	447	454	(K)STVRAFLK(R)

P38414 / Pepsin A0AT31 / Pepsin P49252 / Pepsin Q8W4Y8 / Pepsin	905,2515	434 31 576 77	441 39 582 84	(F)TPDHHDAL(F) (A)VTGDLSPCL(T) (Y)NRTEKWA(G) (A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,2515	1	7	(-)MVLMNKK(A)
P38414	926,181	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	926,181 926,181	689 689	695 695	(K)SATWWFK(M) (K)SATWWFK(M)
Q8W4Y8 / Pepsin A0AT29 / Pepsin A0AT33 / Pepsin A0AT31 / Pepsin	902,2689	101 65 57 64	108 72 64 71	(Y)KACHNSEI(E) (A)NTTPDRQA(A) (A)NTTPDRQA(A) (A)NTTPDRQA(A)
B3F051 / Kimotripsin	902,2689	1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	902,2689 902,2689	269 269	276 272	(R)DEAFGHVK(S) (R)DEAFGHVK(S)
P38414 / Pepsin	946,5947	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
P38414 / Pepsin	948,3936	801	809	(W)TTDSVPKEA(F)
P49252 / Pepsin	1085,6947	178	186	(F)MKESTVNIY(V)
P49252 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	1085,6947 1085,6947	178 251	186 259	(F)MKESTVNIY(V) (R)EHLVKLFAK(D)
P38414 / Kimotripsin	838,5575	751	757	(Y)DDLAKNY(E)
P38414 / Kimotripsin	867,7	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)
A0AT31 / Tripsin	868,7	70	77	(R)QAACNCMK(S)
B3F051 / Kimotripsin	860,3453	1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
Q8MCR6 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	806,5672 806,5672	428 429	433 434	(Y)RIKYIL(R) (R)IKYILR(L)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	894,5951 894,5951	1 1	8 8	(-)MASLLFGR(G) (-)MASLLFGR(G)
A0AT30 / Tripsin	1127,2946	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	894,5951	98	105	(K)CGVNIPYK(I)
A0AT33 / Tripsin	894,5951	91	98	(K)CGVNIPYK(I)
P02870 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	817,5751 817,5751	66 66	73 73	(K)AVKSTVGR(A) (K)AVKSTVGR(A)
P02870 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	999,593 999,593	231 231	238 238	(K)DVVPEWVR(I) (K)DVVPEWVR(I)
A0AT28 / Tripsin	879,4425	71	78	(R)RAACNCLK(S)
A0AT28 / Tripsin	1243,2657	45	58	(K)GGPGPSPQCCGGVK(R)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Tokluk durumunda protein izolatı sindirimi				
A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	898,6343	5 13	12 20	(L)VMCMVVIA(P) (L)VMCMVVIA(P)
A0AT31 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	898,4773 898,6343 898,6343	98 194 194	105 201 201	(K)CGVNIPYK(I) (K)KSISTFSK(I) (K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin	930,6255	591 322	598 329	(A)MEMSAVVY(K) (I)NPLSEHSF(K)
B3F051 / Pepsin	894,5968	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT29 / Tripsin A0AT33 / Tripsin	894,5968 894,5968	1 91	8 98	(-)MASLLFGR(G) (K)CGVNIPYK(I)
P02870 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin P38414 / Pepsin	873,4972	230 230 326	236 236 333	(L)KDVVPEW(V) (L)KDVVPEW(V) (L)PTDVLSKI(S)
P02870 / Kimotripsin Q93WH6 / Kimotripsin	873,4972	230 230	236 236	(L)KDVVPEW(V) (L)KDVVPEW(V)
A0AT29 / Tripsin	873,4972	325	332	(K)LPTDVLSK(I)

P02870 / Tripsin	873,4972	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
P38414 / Tripsin	873,4972	325	332	(K)LPTDVLSK(I)
P49252 / Tripsin	873,4972	603	609	(K)NREIVNK(D)
P38414 / Pepsin	825,4957	360	366	(I)QVDHSAW(M)
		680	687	(L)VEVGHGDL(K)
A0AT28 / Pepsin		12	18	(A)LMCMVVI(S)
		74	81	(A)CNCLKSSA(G)
Q8MCR6 / Pepsin	847,4776	325	331	(L)SEHSFKL(L)
P02870 / Pepsin	847,4429	84	91	(W)DRDTGNVA(N)
Q93WH6 / Pepsin		84	91	(W)DRDTGNVA(N)
P38414 / Kimotripsin	847,4776	266	272	(Y)LPRDEAF(G)
Q8MCR6 /	847,4429	287	294	(L)ASKNAPFL(M)
Kimotripsin				
Q8MCR6 /	847,4429	447	454	(R)KINATATK(A)
Kimotripsin	847,4776	828	834	(R)NNDESLR(N)
P38414 / Tripsin				
P38414 / Tripsin				
A0AT29 / Tripsin	847,4429	447	454	(R)KINATATK(A)
	847,4776	828	834	(R)NNDESLR(N)
Q93WH6 / Pepsin	1220,3378	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P02870 / Pepsin	1220,3374	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P38414 / Pepsin	905,2507	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,2507	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT29 / Tripsin	905,2507	14	21	(K)GTVILMQK(N)
A0AT31 / Pepsin	895,4773	1	7	(-)MARSMKL(A)
A0AT31 /	895,4773	1	7	(-)MARSMKL(A)
Kimotripsin		164	170	(Y)QSDRIFF(A)
P38414 / Kimotripsin	895,4773	1	8	(-)MASLLFGR(G)
P38414 / Tripsin				
Q8W4Y8 / Pepsin	935,1828	1	8	(-)MVLMNKKA(I)
P38414 / Pepsin		560	567	(Y)RDTMNINA(L)
A0AT29 / Pepsin		32	40	(A)VTSDLSPCL(T)
A0AT33 / Pepsin		24	32	(A)VTSDLSPCL(T)
Q8MCR6 / Tripsin	935,1837	290	297	(K)NAPFLMDK(W)
A0AT30 / Pepsin	952,5996	27	36	(A)VSCGTVTGDL(A)
Q8MCR6 / Pepsin	1056,5289	1	8	(-)MKESQVYL(E)
P49252 / Pepsin		240	249	(L)TSHQPQGPGF(Q)
Q8MCR6 /	1056,5304	1	8	(-)MKESQVYL(E)
Kimotripsin		240	249	(L)TSHQPQGPGF(Q)
P49252 / Kimotripsin	1056,5304	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
A0AT29 / Tripsin	1056,5304	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
P38414 / Tripsin				
A0AT30 / Pepsin	845,3972	96	103	(L)PGKCNVNI(P)
P38414 / Pepsin	926,1805	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin	926,1806	689	695	(K)SATWWFK(M)
P38414 / Tripsin	926,1809	689	695	(K)SATWWFK(M)
A0AT31 / Pepsin	879,4419	1	7	(-)MARSMKL(A)
P49252 / Pepsin		569	575	(Y)NVWVTPY(N)
A0AT29 / Pepsin	823,4146	1	7	(-)MARGMKL(A)
A0AT30 / Pepsin	823,3805	1	7	(-)MARSMNL(A)
B3F051 / Pepsin		1	7	(-)MEKKTVA(A)
A0AT30 /	823,4443	1	7	(-)MARSMNL(A)
Kimotripsin				
A0AT29 /		168	174	(W)VKDAPFF(H)
Kimotripsin				
Q8MCR6 /				

Kimotripsin				
P38414 / Pepsin	948,386	801	809	(W)TTDSVPKEA(F)
B3F051 / Pepsin	878,3776	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT31 / Kimotripsin P49252 / Kimotripsin	879,4425	71	78	(R)RAACNCLK(S)
P49252 / Pepsin	1120,5401	332	341	(L)IPNRDCPPHA(Q)
P38414 / Pepsin P02870 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	1118,2164	776 64 64	775 74 74	(I)TPKNDTLTDL(T) (L)TKAVKSTVGRA(L) (L)TKAVKSTVGRA(L)
P02870 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	855,3644	5 5 1	11 11 7	(L)QTQMISF(Y) (L)QTQMISF(Y) (-)MARSMNL(A)
P02870 / Kimotripsin P38414 / Kimotripsin Q93WH6 / Kimotripsin A0AT30 / Kimotripsin	855,3644	5 5 1	11 11 7	(L)QTQMISF(Y) (L)QTQMISF(Y) (-)MARSMNL(A)
P02870 / Pepsin P38414 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	861,326	200 303 200	207 309 207	(A)TNVLTVTL(T) (L)QLNNPEF(N) (A)TNVLTVTL(T)
P38414 / Kimotripsin A0AT28 / Kimotripsin	861,326	303 5	309 12	(L)QLNNPEF(N) (L)RVSCLVAL(M)
P49252 / Pepsin P38414 / Pepsin Q8MCR6 / Pepsin A0AT28 / Pepsin	1044,3443	20 228 485 94	28 238 492 103	(F)TPLHTQHPL(D) (L)GRPVLGGSSTL(P) (L)ERLSRNRI(W) (A)TLPGKCGVRL(P)
P38414 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	920,6098 920,7426 920,74 920,7458 920,7398 921,7398 921,6098	390 447 447	397 454 454	(L)SFPIKSKL(D) (K)STVRAFLK(R) (K)STVRAFLK(R)
P38414 / Kimotripsin	825,4957	680	687	(L)VEVGHGDL(K)
P38414 / Kimotripsin P38414 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	890,4833 890,4833 890,4833	638 14 122	645 21 127	(Y)ASDGLEIW(A) (K)GTVILMQK(N) (K)YYKNFR(S)
A0AT29 / Tripsin	890,48	14	21	(K)GTVILMQK(N)
P49252 / Kimotripsin A0AT29 / Tripsin	1346,8731 1346,8731	250 824	261 834	(F)QINGTSVSWANW(K) (K)LTQRNNDESLR(N)
P38414 / Kimotripsin	987,4732	754	761	(L)AKNYEKAY(L)
P38414 / Kimotripsin	838,5565	751	757	(Y)DDLAKNY(E)
P38414 /Kimotripsin	867,6984	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)
A0AT31 Tripsin	868,6999	70	77	(R)QAACNCMK(S)
P49252 / Kimotripsin Q8MCR6 / Kimotripsin	1044,3443	20 90	28 98	(F)TPLHTQHPL(D) (Y)YSQIISEGF(S)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	933,1856 933,1856	387 387	394 394	(K)EVLSFPIK(S) (K)EVLSFPIK(S)
P49252 / Tripsin	931,6255	204	210	(K)IVEYHDR(D)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	952,5996 952,5991	621 621	629 629	(K)DPSSPHGVR(L) (K)DPSSPHGVR(L)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin Q8MCR6 / Tripsin	1016,5551 1016,5551 1015,5551	189 189 272	196 196 279	(R)QEELKTLR(G) (R)QEELKTLR(G) (K)DPNIHYVR(Y)
A0AT29 / Tripsin	1118,2164	1	11	(-)MASLLFGRGQK(L)

B3F051 / Tripsin	1118,2164	39	49	(K)GPCIPDGNCNK(H)
P38414 / Tripsin	1118,2164	828	836	(R)NNDESLRNR(Y)
P38414 / Tripsin	1118,2164	561	570	(R)DTMNINALAR(N)
P38414 / Tripsin	1346,8731	824	834	(K)LTQRNNDESLR(N)
A0AT29 / Tripsin	1281,8078	448	459	(K)INATATKAYATR(T)
P38414 / Tripsin	1281,8078	448	459	(K)INATATKAYATR(T)
P38414 / Tripsin	1281,8078	448	459	(K)INATATKAYATR(T)
Q8MCR6 / Tripsin	1282,8078	409	418	(R)ISRNLSHYYK(G)
B3F051 / Tripsin	811,3632	62	67	(R)CRDDFR(C)
B3F051 / Tripsin	811,3771	55	61	(K)EHLLSGR(C)
A0AT30 / Tripsin	1227,2943	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
P02870 / Tripsin	817,5748	66	73	(K)AVKSTVGR(A)
Q93WH6 / Tripsin	817,4359	66	73	(K)AVKSTVGR(A)
Q8MCR6 / Tripsin	1392,8787	140	150	(K)FTYLNYVSDIR(I)
Q93WH6 / Tripsin	874,4972	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Bebek un sindirimi				
A0AT33 / Pepsin	898,6275	5	12	(L)VMCMVVIA(P)
A0AT30 / Pepsin	898,6281	13	20	(L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6307	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin	930,6178	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
Q8MCR6 / Pepsin		322	329	(I)NPLSEHSF(K)
B3F051 / Pepsin	894,5968	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
A0AT29 / Tripsin	894,5968	1	8	(-)MASLLFGR(G)
A0AT29 / Tripsin	894,5698	91	98	(K)CGVNIPYK(I)
B3F051 / Pepsin	920,6099 920,7415 920,7383	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin	920,6099 920,7415 920,7383	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
Q8MCR6 / Tripsin	921,7416	447	454	(K)STVRAFLK(R)
P38414 / Pepsin	905,2515	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,2515	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT29 / Tripsin		14	21	(K)GTVILMQK(N)
A0AT29 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
P38414 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
A0AT30 / Pepsin	952,5991	27	36	(A)VSCGTVTGDL(A)
A0AT29 / Tripsin	952,5991	621	629	(K)DPSSPHGVR(L)
P38414 / Tripsin	952,5991	621	629	(K)DPSSPHGVR(L)
P38414 / Pepsin	926,1808	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin	926,1806	689	695	(K)SATWWFK(M)
P38414 / Tripsin	926,1809	689	695	(K)SATWWFK(M)
Q8W4Y8 / Pepsin	902,269	101	108	(Y)KACHNSEI(E)
A0AT29 / Pepsin		65	72	(A)NTTPDRQA(A)
A0AT33 / Pepsin		57	64	(A)NTTPDRQA(A)
A0AT31 / Pepsin		64	71	(A)NTTPDRQA(A)
B3F051 / Kimotripsin	902,269	1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
A0AT29 / Tripsin	902,269	269	276	(R)DEAFGHVK(S)
Q8MCR6 / Pepsin	827,5096	42	48	(L)FVENVGY(D)
A0AT33 / Pepsin		5	11	(L)VMCMVVI(A)
A0AT30 / Pepsin		13	19	(L)VMCMVVI(A)
Q8MCR6 / Kimotripsin	827,5096	42	48	(L)FVENVGY(D)

P49252 / Pepsin	1085,3048	178	186	(F)MKESTVNIY(V)
P49252 / Kimotripsin	1085,3048	178	186	(F)MKESTVNIY(V)
Q8MCR6 / Tripsin	1085,304	251	259	(R)EHLVKLFAK(D)
P02870 / Pepsin P49252 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	871,5356	5 151 5	11 158 11	(L)QTQMISF(Y) (I)SEIVCSSF(T) (L)QTQMISF(Y)
Q93WH6 / Kimotripsin P02870 / Kimotripsin P49252 / Tripsin	871,5356	5 5 603	11 11 609	(L)QTQMISF(Y) (L)QTQMISF(Y) (K)NREIVNK(D)
P49252 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	813,4347	374 85	380 92	(W)RHTETGI(P) (I)NNLNPGNA(A)
P02870 / Pepsin A0AT33 / Pepsin Q93WH6 / Pepsin	1241,2654	230 1 230	239 11 239	(L)KDVVPEWVRI(G) (-)CVVLVMCMVVI(A) (L)KDVVPEWVRI(G)
P38414 / Pepsin	1022,672	838	846	(Y)GPVKMPYTL(L)
P38414 / Kimotripsin A0AT28 / Kimotripsin	1022,672	838 1	846 9	(Y)GPVKMPYTL(L) (-)MASLRVSCL(V)
Q8MCR6 / Tripsin	1023,672	3	10	(K)ESQVYLER(A)
P38414 / Kimotripsin A0AT31 / Tripsin	867,7005 868,6999	176 70	184 77	(Y)LPSATPAPL(V) (R)QAACNCMK(S)
P49252 / Tripsin	1234,6925	592	602	(R)GDDTLAVWTKK(N)
B3F051 / Kimotripsin	1241,2654	1	11	(-)MEKKTVAALSF(L)
A0AT30 / Tripsin	1227,2925	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	1615,012	70	85	(R)QAACNCMKSAASSITK(L)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Bebek pişmiş mercimek sindirimi				
A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	898,6282	5 13	12 20	(L)VMCMVVIA(P) (L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6307	194	201	(K)KSISTFSK(I)
Q8MCR6 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	955,4885	225 108	232 116	(F)LRNQSSHL(P) (I)STTTNCNTI(K)
B3F051 / Pepsin	920,7422 920,7371	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	920,7422 920,7371 921,7416	390 447	397 454	(L)SFPIKSKL(D) (K)STVRAFLK(R)
Q93WH6 / Pepsin P02870 / Pepsin	1220,3364	119 119	130 130	(A)PVDTKPQTGGGY(L) (A)PVDTKPQTGGGY(L)
P38414 / Pepsin A0AT31 / Pepsin P49252 / Pepsin Q8W4Y8 / Pepsin	905,2518	434 31 576 77	441 39 582 84	(F)TPDHHDAL(F) (A)VTGDLSPCL(T) (Y)NRTEKWA(G) (A)CDKCVCAY(S)
Q8MCR6 / Pepsin P49252 / Pepsin	1056,2697	1 240	8 249	(-)MKESQVYL(E) (L)TSHQPQGPGF(Q)
P38414 / Pepsin	926,1809	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	926,1806 926,1809	689 689	695 695	(K)SATWWFK(M) (K)SATWWFK(M)
Q8MCR6 / Pepsin A0AT33 / Pepsin A0AT30 / Pepsin	827,5087	42 5 13	48 11 19	(L)FVENVGY(D) (L)VMCMVVI(A) (L)VMCMVVI(A)
P49252 / Pepsin	1085,304	178	186	(F)MKESTVNIY(V)
P49252 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	1085,304 1085,304	 251	 259	 (R)EHLVKLFAK(D)
P49252 / Pepsin A0AT31 / Pepsin	1055,2705	525 107	534 116	(L)VVVNPNIKTA(V) (I)STSTNCNTVK(-)

Q8MCR6 / Kimotripsin	1056,2697	1 240	8 249	(-)MKESQVYL(E) (L)TSHQPQGPGF(Q)
P49252 / Kimotripsin	1056,2697	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
A0AT29 / Tripsin P38414 / Tripsin	1056,2697	756	763	(K)NYEKAYLR(T)
P49252 / Pepsin	1080,6527	620	628	(I)HHVPAQEDF(P)
P02870 / Kimotripsin	1080,6527	264	275	(L)GGTSSSKQAADA(-)
Q93WH6 / Kimotripsin				
Q8MCR6 / Kimotripsin Q8MCR6 / Tripsin	1080,6527	435	444	(R)LSCIKTLACK(H)
P38414 / Kimotripsin	905,2518	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT29 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
P38414 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
Q8MCR6 / Kimotripsin	827,5087	42	48	(L)FVENVGY(D)
P38414 / Kimotripsin	867,6999			
A0AT31 / Tripsin	868,6999	70	77	(R)QAACNCMK(S)
A0AT30 / Tripsin	1227,2909	59	70	(K)KLLAAAPTTADR(Q)
A0AT31 / Tripsin	1615,012	70	85	(R)QAACNCMKSAASSITK(L)
B3F51 / Tripsin	1485,9453	39	52	(K)GPCIPDGNCNKHCK(E)
P49252 / Tripsin	1504,9461	72	84	(K)YETSPTLISIPRK(I)
Q8MCR6 / Tripsin	1392,8762	140	150	(K)FTYLNYVSDIR(I)
Q8MCR6 / Tripsin	1503,9461	362	374	(K)KIDIIVPILPLIR(S)
Protein kodu / Enzim	Moleküler ağırlığı (Da)	Başlangıç	Son	Sekans
Bebek protein izolatı sindirimi				
A0AT33 / Pepsin	898,6326	5	12	(L)VMCMVVIA(P)
A0AT30 / Pepsin		13	20	(L)VMCMVVIA(P)
Q8MCR6 / Tripsin	898,6307	194	201	(K)KSISTFSK(I)
P38414 / Pepsin	930,6246	591	598	(A)MEMSAVVY(K)
Q8MCR6 / Pepsin		322	329	(I)NPLSEHSF(K)
P02870 / Pepsin	873,4955	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 / Pepsin		230	236	(L)KDVVPEW(V)
P38414 / Pepsin		326	333	(L)PTDVLSKI(S)
P02870 / Kimotripsin	873,4955	230	236	(L)KDVVPEW(V)
Q93WH6 /		230	236	(L)KDVVPEW(V)
Kimotripsin	873,4955	325	332	(K)LPTDVLSK(I)
A0AT29 / Tripsin	873,4955	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
P02870 / Tripsin	873,4955	603	609	(K)NREIVNK(D)
P49252 / Tripsin Q93WH6 / Tripsin	873,4955	61	68	(K)LTLTKAVK(S)
B3F051 / Pepsin	920,6097 920,7398 920,742	1	8	(-)MEKKTVAA(L)
P38414 / Kimotripsin	920,6097 920,7398 920,742	390	397	(L)SFPIKSKL(D)
Q8MCR6 / Tripsin	920,7416	447	454	(K)STVRAFLK(R)
Q8MCR6 / Pepsin	847,4429	325	331	(L)SEHSFKL(L)
P02870 / Pepsin		84	91	(W)DRDTGNVA(N)
Q93WH6 / Pepsin		84	91	(W)DRDTGNVA(N)
P38414 / Kimotripsin	847,4429	266	272	(Y)LPRDEAF(G)
Q8MCR6 /		287	294	(L)ASKNAPFL(M)
Kimotripsin		287	294	(L)ASKNAPFL(M)
Q8MCR6 /	847,4429	447	454	(R)KINATATK(A)
Kimotripsin	847,4429	828	834	(R)NNDESLR(N)

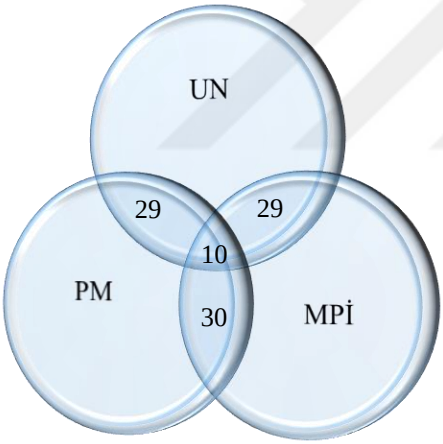
A0AT29 / Tripsin	847,4429	447	454	(R)KINATATK(A)
	847,4429	828	834	(R)NNDESLR(N)
P38414 / Tripsin				
Q93WH6 / Pepsin	1220,3374	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P02870 / Pepsin	1220,3382	119	130	(A)PVDTKPQTGGGY(L)
P38414 / Pepsin	905,252	434	441	(F)TPDHHDAL(F)
A0AT31 / Pepsin		31	39	(A)VTGDLSPCL(T)
P49252 / Pepsin		576	582	(Y)NRTEKWA(G)
Q8W4Y8 / Pepsin		77	84	(A)CDKCVCAY(S)
P38414 / Kimotripsin	905,252	1	7	(-)MVLMNKK(A)
A0AT29 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
P38414 / Tripsin	905,252	14	21	(K)GTVILMQK(N)
A0AT30 / Pepsin	952,5999	27	36	(A)VSCGTVTGDL(A)
A0AT29 / Tripsin	952,5999	261	268	(R)SDTVYLPR(D)
	952,5999	621	629	(K)DPSSPHGVR(L)
A0AT29 / Tripsin	952,5999	99	106	(K)CNVNIPYK(I)
Q8MCR6 / Tripsin	952,5999	290	297	(K)NAPFLMDK(W)
P38414 / Pepsin	926,1806	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)
A0AT29 / Tripsin	926,1806	689	695	(K)SATWWFK(M)
Q8W4Y8 / Pepsin	859,3918	29	35	(A)RFDSTSF(I)
A0AT30 / Pepsin		65	72	(A)PTTADRQA(A)
P38414 / Pepsin	800,5595	61	67	(F)LGRSVRL(R)
P38414 / Kimotripsin	800,5595	61	67	(F)LGRSVRL(R)
A0AT29 / Tripsin	800,5595	859	866	(R)GIPNSISI(-)
P38414 / Tripsin	800,5595	859	866	(R)GIPNSISI(-)
Q8MCR6 / Tripsin	800,5595	440	446	(K)TLACKHK(S)
P38414 / Kimotripsin	987,4742	754	761	(L)AKNYEKAY(L)
B3F051 / Kimotripsin	860,4598	1	9	(-)MEKKTVAAL(S)
Q8MCR6 / Kimotripsin	1158,5245	115	123	(L)EEAEIIKYY(K)
A0AT29 / Tripsin	1281,8066	448	459	(K)INATATKAYATR(T)
Q8MCR6 / Tripsin	1281,8066	409	418	(R)ISRNLSHYYK(G)
A0AT31 / Tripsin	868,1143	70	77	(R)QAACNCMK(S)

Tablo 10, 11 ve 12'de sırasıyla açlık durumu, tokluk durumu ve bebek sindirimi örneklerinde ortak olarak açığa çıkan peptitler gösterilmiştir. Üç farklı sindirim protokolü sonucunda ortak açığa çıkan peptitlerin sayısı sırasıyla 10, 28 ve 16 tanedir (Şekil 21-23). Ayrıca bu peptitlere ait biyoaktivite skorları verilmiştir. Bebek sindiriminde biyoaktif olma olasılığı yüksek olan peptitlerin PeptideRanker skorları yaklaşık 0.58, 0.68, 0.94 olarak sırasıyla A0AT29, P38414, A0AT31 proteinlerinde belirlenmiştir. Skor 1'e ne kadar yakınsa biyoakitivitesi o kadar yüksektir. Genel olarak 0.5 eşik değerinin üzerinde olan peptitler ilgili biyoaktivite açısından etkin peptitler olarak tanımlanmaktadır. Ek olarak bu skorun 0.8'den yüksek olmasının aktivitenin yüksek olduğunun bir göstergesi olduğu, eğer veri tabanlarında aktivite belirtilmemişse yeni çalışmalar ile desteklenebileceği bildirilmiştir (Ngoh and Gan, 2018). Tokluk durumunda ise A0AT29 ve P38414 proteinine ait peptitler için PeptideRanker skoru yaklaşık 0.94, P38414 ve A0AT29

proteinlerinde 0.84, P38414 proteininde 0.69 ve A0AT33 proteininde ise 0.56 olarak belirlenmiştir. Açlık durumunda ise A0AT31 proteinine ait peptit için yaklaşık 0.58 olarak belirlenmiştir.

Tablo 10 Açlık durumunda tüm örneklerde ortak olarak açığa çıkan peptitler

Protein kodu/Enzim	Başlangıç	Son	Sekans	Biyoaktif olma olasılığı
A0AT33 / Pepsin	5	12	(L)VMCMVVIA(P)	0.290426
A0AT30 / Pepsin	13	20	(L)VMCMVVIA(P)	0.290426
P38414 / Pepsin	591	598	(A)MEMSAVVY(K)	0.119821
Q8MCR6 / Pepsin	322	329	(I)NPLSEHSF(K)	0.371142
P49252 / Tripsin	204	210	(K)IVEYHDR(D)	0.0822949
B3F051 / Pepsin	1	8	(-)MEKKTVAA(L)	0.0776239
P38414 Kimotripsin	390	397	(L)SFPIKSKL(D)	0.333966
Q8MCR6 / Tripsin	447	454	(K)STVRAFLK(R)	0.341546
P38414 / Kimotripsin	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)	0.480829
A0AT31 / Tripsin	70	77	(R)QAACNCMK(S)	0.578916

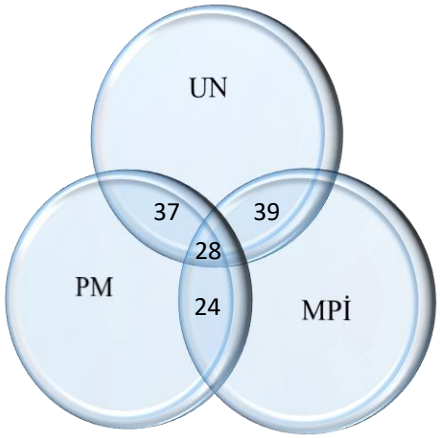


Şekil 21 Açlık durumunda ortak olarak açığa çıkan peptitler

Tablo 11 Tokluk durumunda tüm örneklerde ortak olarak açığa çıkan peptitler

Protein kodu/Enzim	Başlangıç	Son	Sekans	Biyoaktif olma olasılığı
P38414 / Pepsin	591	598	(A)MEMSAVVY(K)	0.119821
Q8MCR6 / Pepsin	322	329	(I)NPLSEHSF(K)	0.371142
A0AT33 / Pepsin	5	12	(L)VMCMVVIA(P)	0.228582
A0AT30 / Pepsin	13	20	(L)VMCMVVIA(P)	0.228582

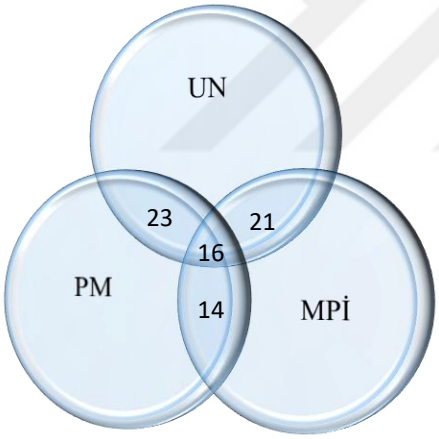
B3F051 / Pepsin	1	8	(-)MEKKTVAA(L)	0.0776239
A0AT29 / Tripsin	1	8	(-)MASLLFGR(G)	0.83488
A0AT33 / Tripsin	91	98	(K)CGVNIPYK(I)	0.563206
P38414 / Tripsin	1	8	(-)MASLLFGR(G)	0.83488
P38414 / Pepsin	591	598	(A)MEMSAVVY(K)	0.119821
Q8MCR6 / Pepsin	322	329	(I)NPLSEHSF(K)	0.371142
P38414/Kimotripsin	390	397	(L)SFPIKSKL(D)	0.333966
Q8MCR6 / Tripsin	447	454	(K)STVRAFLK(R)	0.341546
P38414 / Pepsin	434	441	(F)TPDHHDAL(F)	0.68794
A0AT31 / Pepsin	31	39	(A)VTGDLSPCL(T)	0.350606
P49252 / Pepsin	576	582	(Y)NRTEKWA(G)	0.221159
Q8W4Y8 / Pepsin	77	84	(A)CDKCVCAY(S)	0.44421
P38414 / Pepsin	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)	0.378247
A0AT29 / Tripsin	689	695	(K)SATWWFK(M)	0.939307
P38414 / Tripsin	689	695	(K)SATWWFK(M)	0.939307
P38414 / Kimotripsin	1	7	(-)MVLMNKK(A)	0.149048
A0AT29 / Tripsin	14	21	(K)GTVILMQK(N)	0.160167
P38414 / Pepsin	434	441	(F)TPDHHDAL(F)	0.68794
A0AT31 / Pepsin	31	39	(A)VTGDLSPCL(T)	0.350606
P49252 / Pepsin	576	582	(Y)NRTEKWA(G)	0.221159
Q8W4Y8 / Pepsin	77	84	(A)CDKCVCAY(S)	0.44421
P38414 / Kimotripsin	751	757	(Y)DDLAKNY(E)	0.12671
P38414 /Kimotripsin	176	184	(Y)LPSATPAPL(V)	0.480829
A0AT31 Tripsin	70	77	(R)QAACNCMK(S)	0.578916
P02870 / Tripsin	66	73	(K)AVKSTVGR(A)	0.130938
Q93WH6 / Tripsin	66	73	(K)AVKSTVGR(A)	0.130938



Şekil 22 Tokluk durumunda ortak olarak açığa çıkan peptitler

Tablo 12 Bebek sindirimmodelinde tüm örneklerde ortak olarak açığa çıkan peptitler

Protein kodu/Enzim	Başlangıç	Son	Sekans	Biyoaktif olma olasılığı
A0AT33 / Pepsin	5	12	(L)VMCMVVIA(P)	0.228582
A0AT30 / Pepsin	13	20	(L)VMCMVVIA(P)	0.228582
Q8MCR6 / Tripsin	194	201	(K)KSISTFSK(I)	0.231972
B3F051 / Pepsin	1	8	(-)MEKKTVAA(L)	0.0776239
P38414 / Kimotripsin	390	397	(L)SFPIKSKL(D)	0.333966
Q8MCR6 / Tripsin	447	454	(K)STVRAFLK(R)	0.341546
P38414 / Pepsin	434	441	(F)TPDHHDAL(F)	0.68794
A0AT31 / Pepsin	31	39	(A)VTGDLSPCL(T)	0.350606
P49252 / Pepsin	576	582	(Y)NRTEKWA(G)	0.221159
Q8W4Y8 / Pepsin	77	84	(A)CDKCVCAY(S)	0.44421
P38414 / Kimotripsin	1	7	(-)MVLMNKK(A)	0.149048
A0AT29 / Tripsin	14	21	(K)GTVILMQK(N)	0.160167
P38414 / Tripsin	14	21	(K)GTVILMQK(N)	0.160167
P38414 / Pepsin	353	359	(L)KFPPPKVI(Q)	0.378247
A0AT29 / Tripsin	689	695	(K)SATWWFK(M)	0.939307
A0AT31 / Tripsin	70	77	(R)QAACNCMK(S)	0.578916



Şekil 23 Bebek sindiriminde ortak açığa çıkan peptitler

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında gıda matrisi ve pişirme işlemi (ısıl işlem) etkisi üç farklı Gİ senaryo (bebek, tokluk ve açlık) ile birlikte değerlendirilmiştir. Sindirim koşulları mercimekten izole edilen protein karışımına uygulanmış ve elde edilen sonuçlar gıda formunda tüketilen mercimek ve mercimek ununda proteinin hidrolizi/sindirilirliği ile kıyaslanarak gıda matrisinin etkisi ortaya konmuştur. Sonuçlar izolattaki protein hidrolizinin daha etkin olduğunu ve mercimekten peptitlerin daha kolay/fazla açığa çıktığını göstermiştir. Bu sonuç gıda matrisinin protein hidrolizini etkilediğini ve sınırladığını göstermektedir.

Isıl işlemin mercimekteki protein hidrolizi/sindirimi üzerine etkisini belirlemek için mercimek protein izolatı ve mercimek unu için elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve ısıl işlemin üç farklı Gİ koşulundaki etkisi ortaya konmuştur. Isıl işlem, tüm sindirim protokollerinde protein hidrolizini az da olsa olumlu etkilese de bu oran önemli seviyede değildir. LC/Q-TOF/MS analizi sonuçları ısıl işlemin lektinlerin parçalanması üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir. *İn vitro* bebek sindiriminde düşük proteoliz etkinliği neticesinde diğer sindirim protokollerine göre daha az peptit açığa çıkmıştır.

İn vitro mide sindirimi sırasında protein hidrolizi OPA analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm koşullar arasında 60 dakika sindirim sonunda en yüksek hidroliz derecesi %58.90 ile tokluk durumunda mercimek ununda saptanmıştır. Bunu tokluk durumunda protein izolatı (%35.55) ve açlık durumunda protein izolatı (%35.25) için saptanan hidroliz değerleri izlemiştir. Ancak midede %HD değeri artış oranı pişmiş mercimekteki proteinlerin açlık (yetişkin) *in vitro* sindirim sonuçları aynı koşullardaki un örneği için saptanan %HD değeri artışından daha yüksek olmuştur. Isıl işlemin proteinlerin hidroliz sürecini olumlu etkilediği söylenebilir. İlginç olan bir bulgu bebek *in vitro* mide sindirimi koşullarında pişmiş mercimek proteinlerinin hidroliz derecesinin diğer koşullara (açlık ve tokluk durumu) göre daha yüksek olmasıdır. Ek olarak, mercimek protein izolatı dışında tüm örneklerde en düşük hidroliz derecesi açlık durumundaki *in vitro* mide sindiriminde saptanmıştır. Buna karşılık mide süresi boyunca gerçekleşen hidroliz seyri incelendiğinde hidrolizde en yüksek artış tokluk durumunda mercimek

proteini izolatı örneğinde, en düşük artış ise bebek sindirimi koşullarında mercimek proteini izolatında gerçekleşmiştir. Mercimek unu ve pişmiş mercimek örneklerinde protein hidrolizi, açlık durumunda tokluk durumuna göre daha yavaş ilerlemiştir. Açlık durumunda ve bebek sindirim koşulunda protein hidroliz derecesi proteinlerin alerjen etkisini gösteren bir değerdir. Bu sonuç SDS-Page analizi sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde tüm örneklerde *in vitro* mide sindirimi boyunca hidrolize olmayan ve M_A 42-45 kDa olan protein bandının varlığı (Akkardeas et al., (2012) tarafından bu M_A'ya sahip alerjen protein rapor edilmiştir) OPA analizi sonuçları ile örtüşmektedir.

İn vitro mide+ince bağırsak sindirimi sonunda en yüksek hidroliz derecesi bebek sindirim koşullarında sindirime uğratılan mercimek unu için saptanmıştır. Ayrıca protein hidrolizinin değerlendirildiği SDS-Page sonuçları ile LC/Q-TOF/MS analizi sonuçlarının paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. *İn vitro* bebek sindirimi sonrasında açığa çıkan peptitlerin diğer sindirim koşullarında açığa çıkan peptitlere göre daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Biyoaktivite değerlendirilmesi yapıldığında ise tokluk durumunda 6 peptitin skorları 1'e yakın bulunurken, bebek sindiriminde 3 peptit ve açlık sindirimde 1 peptitin biyoaktivite skorları 1'e yakın bulunmuştur. Açığa çıkan peptitlerin biyoaktiviteleri değerlendirildiğinde ise ADE inhibitörü, antioksidan ve dipeptidil peptidaz 4 enzimi inhibitörü özellikleri görülmüştür.

Sonuç olarak açlık durumunda pişmiş mercimek, mercimek unu ve izolat örneklerinde ve tokluk durumu izolat örneklerinde açığa çıkan protein miktarları (%) yüksek bulunmuştur. En yüksek DH değeri sırasıyla tokluk durumu, açlık durumu izolat, tokluk durumu izolat ve bebek sindirimi un örneğinde yüksek çıkmıştır. Ancak hidrolizin artış oranı açlık koşullarında sindirim uygulanmış pişmiş mercimekte en yüksek bulunmuştur. Bu sonuç açığa çıkan % protein miktarı ile paralellik göstemektedir. İnce bağırsak sindiriminde ise protein hidroliz derecesi bebek sindirimi koşullarında un ve açlık durumu koşullarında un örneğinde en yüksek çıkmıştır. Hidroliz seyri en düşük bebek sindiriminde gerçekleşirken, en yüksek tokluk sindirimi örneklerinde görülmüştür.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abraham, R. (2015). Lentil (Lens culinaris Medikus) current status and future prospect of production in Ethiopia. *Advances in Plants Agricultural Research, 2*(2), 00040.

Abrahamse, E., Minekus, M., van Aken, G. A., van de Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., & Ludwig, T. (2012). Development of the digestive system—experimental challenges and approaches of infant lipid digestion. *Food Digestion*, *3*(1), 63-77.

Adak, M. S., Güler, M., Kayan, N., (2009). Yemeklik Baklagillerin Üretimini ArtırmaOlanakları, http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/1f860e3b7f548ab_ek.pdf (Erişim Tarihi: 30.05.2018)

Agostoni, C., Scaglioni, S., Ghisleni, D., Verduci, E., Giovannini, M. and Riva, E. (2005). How much protein is safe? *International Journal of Obesity*, *29*(2), S8-S13.

Ainis, W. N., Ersch, C., and Ipsen, R. (2018). Partial replacement of whey proteins by rapeseed proteins in heat-induced gelled systems: Effect of pH. *Food Hydrocolloids, 77*, 397–406.

Akıllıoğlu, H. G. ve Karakaya, S. (2009). "Effect of Some Domestic Cooking Methods on Antioxidant Activity, Total Phenols and Total Flavonoid Content of Common Beans", *Akademik Gıda, 7,* 6-61.

Akıllıoğlu, H.G. ve Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Science and Biotechnology, 19(3), 633-639.*

Akibode, S. and Maredia, M. (2012). Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. *Report submitted to CGIAR Standing Panel on Impact Assessment (SPIA)*

Akkerdaas, J., Finkina, E.I., Balandin, S.V., Santos Magadán, S., Knulst, A., Fernandez-Rivas, M., Asero, R., van Ree, R. and Ovchinnikova, T.V.

(2012). Lentil (Lens culinaris) Lipid Transfer Protein Len c 3: A Novel Legume Allergen. *International Archives of Allergy and Immunology, 157(1), 51–57.*

Alves, A. C. and Tavares, G. M. (2019). Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno functionalities*? Food Hydrocolloids, 97*, 105171.

Amara, S., Patin, A., Giuffrida, F., Wooster, T. J., Thakkar, S. K., Bénarouche, A., & Carrière, F. (2014). *In vitro* digestion of citric acid esters of mono-and diglycerides (CITREM) and CITREM-containing infant formula/emulsions. *Food & Function, 5(7),* 1409- 1421.

Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European J. of Lipid Sci. and Tech., 110*, 865-878.

AOAC official method 990.03, (2006). Protein (crude) in animal feed, combustion method. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg: ASA-SSA Inc

Armand, M., Hamosh, M., Mehta, N. R., Angelus, P. A., Philpott, J. R., Henderson, T. R., ... & Hamosh, P. (1996). Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. *Pediatric research*, *40*(3), 429-437.

Aryee, Alberta NA, and Joyce I. Boye. *(2016*) "Improving the digestibility of lentil flours and protein isolate and characterization of their enzymatically prepared hydrolysates." *International journal of food properties 19.12*: 2649-2665.

Aryee, Alberta N.A.; Boye, Joyce I. (2016). Comparative Study of the Effects of Processing on the Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. *Journal of Food Processing and Preservation.*

Avilés-Gaxiola S, Chuck-Hernández C, Serna Saldívar SO. (2018) Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review. *J Food Sci;83*:17–29

Barbana, C., & Boye, J. I. (2013). *In vitro* protein digestibility and physico-chemical properties of flours and protein concentrates from two varieties of lentil (Lens culinaris). *Food & function*, *4*(2), 310-321.

Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (2004). Handbook of proteolytic enzymes, (2nd ed.). *Academic Press*, London.

Bhatty, R.S. (1988). Composition and Quality of Lentil (Lens culinaris Medik): A Review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 21*(2), 144–160.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols, 14(4),* 991–1014

Blanquet, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R., et al. (2004). A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research, 21(4),* 585e591.

Bohn T., Carriere F., Day L., Deglaire A., Egger L., Freitas D., Golding M., Le Feunteun S., Macierzanka A., Menard O., Miralles B., Moscovici A., Portmann R., Recio I., Rémond D., Santé-Lhoutelier V., Wooster TJ., Lesmes U., Mackie AR., Dupont D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr. 58(*13):2239-2261.

Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M. N., Robert, B., Deglaire, A., Pezennec, S., Bouhallab, S., Carrière, F., Dupont, D. (2015). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during *in vitro* gastric digestion. *Food Chemistry, 182*(), 224–235.

Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S. Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth; E. Rajamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. 43(2), 0–546.

Boye, J. I. Roufik, S. Pesta N. and Barbana, C. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-Page of red lentil protein hydrolysates, *LWT–Food Sci. Technol.*, 43, 987–991

Carbonaro M., Maselli P., Nucara A. (2014). "Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties", *Food Research International, 76,* 19-30.

Davis J. C., Lewis Z. T., Krishnan S., Bernstein R. M., Moore S. E., Prentice A. M., Mills D. A., Lebrilla C. B., Zivkovic A. M. (2017) Growth and morbidity of Gambian infants are influenced by maternal milk oligosaccharides and infant gut microbiota. *Sci Rep;7*:40466

De Almeida Costa, G. E., Queiroz-Monici, K. S., Machado Reis S. M. P., and De Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes, *Food Chem.*, 94, 327–330

De Mejía, E. G., Prisecaru, V. I. (2005). Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. , 45(6), 425–445

de Oliveira, S. C., A. Deglaire, O. Menard, A. Bellanger, F. Rousseau, G. Henry, E. Dirson, F. Carriere, D. Dupont, and C. Bourlieu. (2016). Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under *in vitro* dynamic term newborn digestion. *Food Research International 88*:263–275.

Devi, S., Varkey, A., Dharmar, M., Holt, Roberta R., Allen, Lindsay H., Sheshshayee, M S; Preston, T., Keen, Carl L; Kurpad, Anura V (2020). Amino Acid Digestibility of Extruded Chickpea and Yellow Pea Protein is High and Comparable in Moderately Stunted South Indian Children with Use of a Dual Stable Isotope Tracer Method. *The Journal of Nutrition, volume 150 issue 5*, Pages 1178-1185

Devi S., Varkey A., Sheshshayee M. S., Preston T., Kurpad A. V. (2018) Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *Am J Clin Nutr;107:*984–91.

Drulyte, D., Orlien, V., (2019). *The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins. Foods, 8(6), 224.*

Dupont D., Mandalari G., Mollé D., Jardin J., Rolet-Répécaud O., Duboz G., Léonil J., Mills C. E., Mackie A. R. (2010) Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. Mol Nutr Food Res. Nov;54(11):1677-89.

Egounlety M. (2002). Production of legume-fortified weaning foods. 35(2-3), 0–237.

Ekaterina I. F., Elena I. S., Andrey A. T., Tatiana V. O. (2008). *A novel defensin from the lentil Lens culinaris seeds. , 371(4), 0–865.*

Elkowicz, K., and Sosulski F. W. (1982). *Antinutritive Factors in Eleven Legumes and Their Air-classified Protein and Starch Fractions. , 47(4), 1301–1304.*

European Union, (2016) Commission directive 2016/127/EC of 25 september 2015 on infant formulas and follow-on formulas and completed regulation n° 609/2013 and amending directive 2006/141/EC (Journal of the European Union: The Commission of the European Communities No. European Commission).

Fang, Z. W., He, Y. Q., Liu, Y. K., Jiang, W. Q., Song, J. H., Wang, S. P., & Yin, J. L. (2020). Bioinformatic identification and analyses of the non-specific lipid transfer proteins in wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, *19*(5), 1170-1185.

FAO, (2021). Food and Agrıculture Organızatıon of The Unıted Natıons Statistics DivisionHttp://Faostat. Fao. Org. (Erişim Tarihi 25.05.2021)

Garcia, C., F., Solis-Miranda, J., Pacheco, R., and Quinto, C. (2021) Non-specific Lipid Transfer Proteins in Legumes and Their Participation During Root-Nodule Symbiosis ,*Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico*

García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martinez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464–472.

Gianfrani, C., Mamone, G., la Gatta, B., Camarca, A., Di Stasio, L., Maurano, F., Picascia, S., Capozzi, V., Perna, G., Picariello, G., Di Luccia, A., (2017). Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food Chem. Toxicol. 101*, 105–113

Gianluca, P Stasio, L.D., Nitride,C., Mamone,G., Ferranti, P. (2020). Reference Module in Food Science || *Food Protein Digestomics*.

Gómez-Martín, M., Arboleya, S., Gueimonde, M., González, S. (2019). Nutritional composition of processed baby foods targeted at infants from 0–12 months. *Journal of Food Composition and Analysis, Volume 79*(),55-62.

Gutiérrez-Uribe, J.A. (2016). Encyclopedia of Food and Health || *Legumes in the Diet. First edition,* 539–543.

Gupta, K., Iskandar, S. S., Daeihagh, P., Ratliff, H. L., & Bleyer, A. J. (2008). Distribution of pathologic findings in individuals with nephrotic proteinuria according to serum albumin. *Nephrology Dialysis Transplantation, 23*(5), 1595-1599.

Gupta, R., & Dhillon, S. (1993). Characterization of seed storage proteins of Lentil (Lens culinaris M.). *Annals of Biology (India).*

Gülaç, Z. N. (2021). Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü, **TEPGE.**

Han, I. H., Swanson, B. G., Baik, Byung-Kee (2007). *Protein Digestibility of Selected Legumes Treated with Ultrasound and High Hydrostatic Pressure During Soaking. Cereal Chemistry, 84(5), 518–521.*

Hefnawy, T.H. (2011). Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (Lens culinaris). , 56(2), 57–61.

Hernández-Salazar, M., Osorio-Diaz, P., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., Tovar, T., Bello-Pérez, L.,A. (2010). *In vitro* fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (Phaseolus vulgaris L.), lentils (Lens culinaris L.) and chickpeas (Cicer arietinum L.). , *90(9),* 1417–1422.

Herwade, A. P., Kasar, S. S., Rane, N. R., Ahmed, S., Maras, J. S., & Pawar, P. K. (2021). Characterization of a Bowman–Birk type trypsin inhibitor purified from seeds of Solanum surattense. *Scientific reports, 11*(1), 1-10.

Hsu, H.S., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., Miller, G.A. (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. Journal of Food Science, 42: 1269-1273.

Jarpa-Parra, M., Wong, L., Wismer, W., Temelli, F., Han, J., Huang, W., ... & Chen, L. (2017). Quality characteristics of angel food cake and muffin using lentil

protein as egg/milk replacer. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(7), 1604-1613.

Kashyap S., Varkey A., Shivakumar N., Devi S., Reddy BHR., Thomas T., Preston T., Sreeman S., Kurpad AV. (2019) True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. *Am J Clin Nutr;110*:873–82.

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International, 64*, 567–576.

Kün, E., Çiftçi, C., Y., Birsin, M., Ülger, A., C., Karahan, S., Zencirci, N., Öktem, A., Güler, M., YILMAZ, N., ATAK, M., (2004). Tahıl ve Yemeklik Dane Baklagiller,Üretimi.http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/11a7a84d3d5ce4d_ek.pdf?tipi=14&sube= (Erişim Tarihi: 20.05.2018)

Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, *227*, 680–685.

Laminu, H., Sheriff, M., & Modu, B. (2016). Studies on the Rheological, Microbiological and Sensory Qualities of Weaning Food Formulated from Pearl Millet, Wheat, Cowpea and Groundnut. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, *7*(2), 1-10.

Linsberger-Martin, G.; Weiglhofer, K.; Thi Phuong, T.; Berghofer, E. (2013) High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and *in vitro* protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT Food Sci. Technol., 51*, 331–336.

Lund M. N, Ray C. A. (2017) Control of Maillard reactions in foods: strategies and chemical mechanisms. *J Agric Food Chem;65*: 4537–52

Luo, Q., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2015). Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. LWT - Food Science and Technology, 63(1), 161–168.

Melito, C., Tovar J. (1995). *Cell walls limit in vitro protein digestibility in processed legume seeds. , 53(3), 305–307.*

Ménard, O., Bourlieu, C., De Oliveira, S. C., Dellarosa, N., Laghi, L., Carrière, F., … Deglaire, A. (2018). A first step towards a consensus static *in vitro* model for simulating full-term infant digestion. *Food Chemistry, 240,* 338– 345.

Michaelsen, K. F., & Greer, F. R. (2014). Protein needs early in life and long-term health. *The American Journal of Clinical Nutrition, 99(3),* 718S-722S.

Michel, F., Costa, M., Doucet, A. J., & Ferat, J. L. (2007). Specialized lineages of bacterial group II introns. *Biochimie, 89*(4), 542-553.

Miller, K. F., Borsch, T and Hilu, K. W., (2006). Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: Contrasting matK, trnT- F, and rbcL in basal angiosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 99–117.

Mills, E. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., & Mackie, A. R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular nutrition & food research, 53*(8), 963-969.

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

Mooney, Catherine; Haslam, Niall J.; Pollastri, Gianluca; Shields, Denis C.; Kurgan, Lukasz (2012). Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. PLoS ONE, 7(10), e45012–. doi:10.1371/journal.pone.0045012

Monsoor, M.A. Yusuf H.K.M. (2002), *In vitro* protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus satirus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) International Journal of Food Science and Technology, 37, pp. 97-99

Negi, A., Boora, P., Khetarpaul, N. (2001) Starch and protein digestibility of newly released moth bean cultivars: Effect of soaking, dehulling, germination and pressure cooking. *Nahrung*, *45*, 251–254.

Neves, V. A., & Lourenço, E. J. (1995). Isolation and *in vitro* hydrolysis of globulin G1 from lentils (Lens Culinaris, Medik). *Journal of Food Biochemistry*, *19*(2), 109-120.

Nielsen, P. M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis Food Science", 66, 642-646.

Ngoh, Y.Y., Gan, C.Y., (2018). Identification of Pinto bean peptides with inhibitory effects on α-amylase and angiotensin converting enzyme (ACE) activities using an integrated bioinformatics-assisted approach. Food Chemistry 267, 124–131.

Nguyen, T. T. P., Bhandari, B., Cichero, J., & Prakash, S. (2016). *In vitro* digestion of infant formulations with hydrolysed and non-hydrolysed proteins from dairy and soybean. *Food &Function, 7*, 4908-4919.

Perçin, P.S., (2020) Bazı ekmek çeşitlerindeki biyoaktif peptitlerin *in silico* ve *in vitro* sindirim yaklaşımları ile belirlenmesi ve biyoaktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitiüsü, İzmir

Pihlanto, A., Mattila, P., Mäkinen, S., & Pajari, A. M. (2017). Bioactivities of alternative protein sources and their potential health benefits. *Food & function*, *8*(10), 3443-3458

Pii, Y., Astegno, A., Peroni, E., Zaccardelli, M., Pandolfini, T., & Crimi, M. (2009). The Medicago truncatula N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti. *Molecular plant-microbe interactions*, *22*(12), 1577-1587.

Planque, M., Arnould, T., Gillard, N., (2017). Food allergen analysis: detection, quantification and validation by mass spectrometry. Allergen 7.

Potier, M., Tomé, D., (2008)Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolysates. *AOAC International, 91*(4) 1002-1005

Raggy, E. M. Galbusera, V. Scarafoni, A. Negri, A. Tedeschi, G. Consonni, A. Sessa F. and Duranti, M. (2006). Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman–Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds, *FEBS J.*, 273, 4024–4039

Rameshwari, R., Madhu, S., Prasad, V., & Chapadgaonkar, S. (2015). Computational analysis of tuberization protein linoleate 9S-lipoxygenase 3 from Solanum tuberosum. *International Journal of Chemtech Research*, *8*(10), 294-310.

Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods in enzymology*, *244*, 461-486

Reynaud, Y. Lopez, M., Riaublanc, A. Souchon I. and Dupont, D. (2020). "Hydrolysis of plant proteins at the molecular and supra-molecular scales during *in vitro* digestion", *Food Res. Int., 134*, 109-204.

Rochfort, S., & Panozzo, J. (2007). Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(20), 7981-7994.

Roman, C., Carrière, F., Villeneuve, P., Pina, M., Millet, V., Simeoni, U., & Sarles, J. (2007). Quantitative and qualitative study of gastric lipolysis in premature infants: do MCT-enriched infant formulas improve fat digestion?. *Pediatric research*, *61*(1), 83-88.

Roux, L. L., Mejean, S., Chacon, R., Lopez, C., Dupont, D., Deglaire, A., Nau, F., Jeantet, R. (2020). Plant proteins partially replacing dairy proteins greatly influence infant formula functionalities. *LWT, 120*, 108891.

Roux, L. L., Chacon, R., Dupont, D., Jeantet, R., Deglaire, A., Nau, F. (2020). *In vitro* static digestion reveals how plant proteins modulate model infant formula digestibility. *Food Research International, 130()*, 108917.

Sajjadi F., Gharipour M., Mohammadifard N., Nouri F., Maghroun M., and Alikhasi H. (2014). Relationship between legumes consumption and metabolic syndrome: findings of the Isfahan Healthy Heart Program. ARYA Atherosclerosis 10: 18–24.

Samaranayaka, A. (2017) Lentil: Revival of Poor Man's Meat .POS Bio-Sciences, Saskatoon, SK, Canada

Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (Cicer arietinum L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, *64*(2), 237-243.

Santos-Hernandez, M., Alfieri, F., Gallo, V., Miralles, B., Masi, P., Romano, A., Ferranti, P., Recio, I. (2020). Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. Food Research International. Volume 137, 109708 https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109708

Schwenke, K.D. (2001) Reflections about the functional potential of legume proteins - a reviewMolecular Nutrition & Food Research, 45 (6), pp. 377-381

Shani-Levi, C., Levi-Tal, S., Lesmes, U. (2013) "Comparative performance of milk proteins and their emulsions under dynamic *in vitro* adult and infant gastric digestion", *Food Hydrocolloids*, *32*(2), 349-357.

Shenkarev, Z. O., Gizatullina, A. K., Finkina, E. I., Alekseeva, E. A., Balandin, S. V., Mineev, K. S., ... & Ovchinnikova, T. V. (2014). Heterologous expression and solution structure of defensin from lentil Lens culinaris. *Biochemical and biophysical research communications*, *451*(2), 252-257.

Siva-Shankar A., Satyanarayana, Ch.V.V. , Alavi, S., Edukondalu, L., Joseph M., ve Lakshmipathy R., (2018). Study on Cereal-Legume Based Complementary Foods for Infants *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 7*(8): 3310-3317

Song, H., Wang, P., Li, C., Han, S., Lopez-Baltazar, J., Zhang, X., & Wang, X. (2016). Identification of lipoxygenase (LOX) genes from legumes and their responses in wild type and cultivated peanut upon Aspergillus flavus infection. *Scientific reports*, *6*(1), 1-9.

Spadafranca A, Rinelli S, Riva A, Morazzoni P, Magni P, Bertoli S, Battezzati A. (2013) Phaseolus vulgaris extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects. Br J Nutr. May 28;109(10):1789-95.

Stoscheck C., M. (1990) Quantitation of protein. *Food Chemistry* *129*, Pages 1513-1522.

Sulieman, M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A., El Tyeb, M. M., El Khalil, E. A., El Tinay, A. H., & Babiker, E. E. (2008). Changes in total protein digestibility,

fractions content and structure during cooking of lentil cultivars. *Pakistan Journal of Nutrition*, *7*(6), 801-805.

Sun, X., Wang, C., Wang, H., & Guo, M. (2018). Effects of Processing on Structure and Thermal Properties of Powdered Preterm Infant Formula: Properties of preterm infant formula. *Journal of Food Science*, *83*(6), 1685–1694.

Sun, J. Y., Gaudet, D. A., Lu, Z. X., Frick, M., Puchalski, B., & Laroche, A. (2008). Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(3), 346-360.

Swanson, B. G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *67*(5), 276-280.

Talley, K., & Alexov, E. (2010). On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *78*(12), 2699-2706.

Tharanathan, R.N and Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes—a boon to human nutrition., 14(12), 0–518

Torcello-Gómez, A., Dupont, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Deglaire, A., Risse, K., Mechoulan, E., Mackie, A. (2020). "Human gastrointestinal conditions affect *in vitro* digestibility of peanut and bread proteins", *Food & Function, 11*, 6921-6932.

Türk Gıda Kodeksi, 2019, Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri ve Devam

Formülleri Tebliği **(Tebliğ No: 2019/14)**

Tzifi, F., Grammeniatis, V., & Papadopoulos, M. (2014). Soy-and rice-based formula and infant allergic to cow's milk. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, *14*(1), 38-46.

USA Dry Pea & Lentil Council Webinar, Erişim:
(http://www.pealentil.com/core/files/pealentil/uploads/files/Webinar_4a.pdf)

Ulloa, J. A., Valencia, M. E., & Garcia, Z. H. (1988). Protein Concentrate from Chickpea: Nutritive Value of a Protein Concentrate from Chickpea (Cicer arietinum) Obtained by Ultrafiltration and Its Potential Use in an Infant Formula. *Journal of Food Science, 53(5),* 1396–1398.

Uzunöz, M., (2009). Türkiye'de Baklagil Ürünlerinde İç Ticaret Hadleri. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Tokat, 26(1): 29-37.

Vanga, S. K., Singh, A., & Raghavan, V. (2015). Effect of thermal and electric field treatment on the conformation of Ara h 6 peanut protein allergen. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 30,* 79-88.

Victora, C. G., Bahl, R., Barros, A. J., França, G. V., Horton, S., Krasevec, J., … others. (2016). Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet, 387(10017),* 475–490.

Wada, Y., and Lönnerdal, B. (2015). Bioactive peptides released by *in vitro* digestion of standard and hydrolyzed infant formulas. *Peptides, 73(),* 101–105.

Weder J. K. P. and Kahley, R. (1998). Isolation and characterisation of flour trypsin-chymotrypsin inhibitors from lentil seeds, *J. Sci. Food Agric.*, 78, 429–434

Wiechelman, K., (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: dent'ficat'on of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem 175*:2317

Xu, B., Chang, Sam K. C. (2010). Phenolic Substance Characterization and Chemical and Cell-Based Antioxidant Activities of 11 Lentils Grown in the Northern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(3)*

7. TEŞEKKÜR

Başta ülkemizin kurucusu ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK olmak üzere,

Lisans eğitimim ve yüksek lisans tez çalışmam boyunca, tecrübe ve bilgilerini her zaman benimle paylaşarak desteklerini esirgemeyen ve yol gösterici olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KARAKAYA'ya,

Lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım boyunca çok değerli bilgileri ile ufkumun genişlemesinde katkısı olan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Nehir EL'e,

Yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şebnem ŞİMŞEK'e,

Yüksek lisans öğrenimim süresince destekleriyle her zaman yanımda olan çalışma arkadaşlarım Ayşen BAŞ, Merve Eda EKER, Hadiye NALBANT, Aycan EDE ve Ece DİNÇTÜRK'E,

Son olarak, hayatım boyunca yanımda olan canım annem Hanife HASSAS ve babam Ali HASSAS'a,

Tez çalışmamda FGA-2021-22680 proje numarası ile malzeme desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

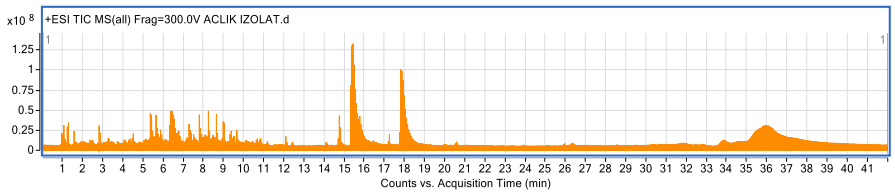
…/…/2022

Esra HASSAS

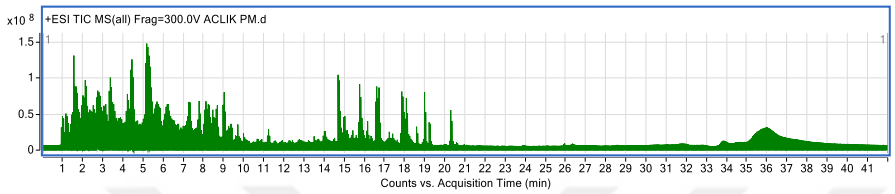
ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve üniversite öğrenimini Bursa'da tamamladı. 2014 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başlayan lisans eğitiminden 2019 yılında onur derecesi ile mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Bilimleri Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

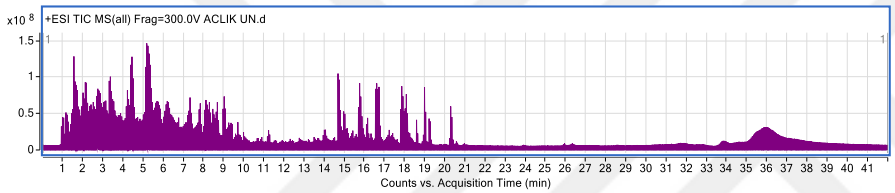
8. EKLER



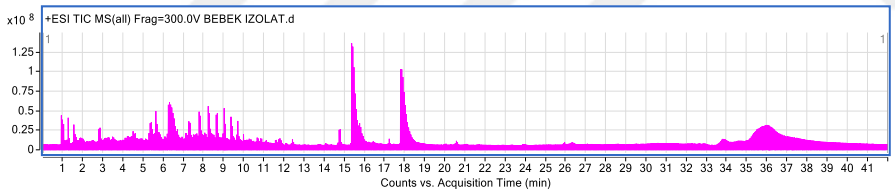
A



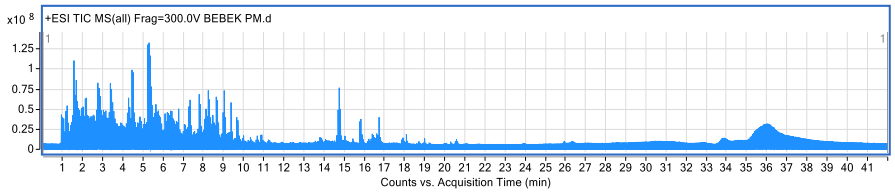
B



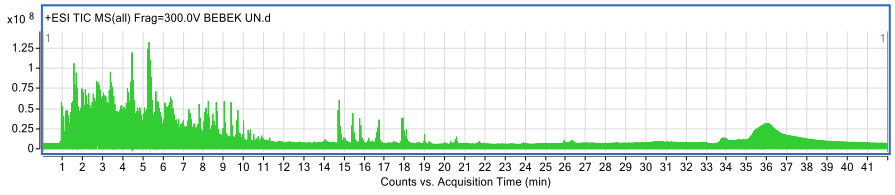
C



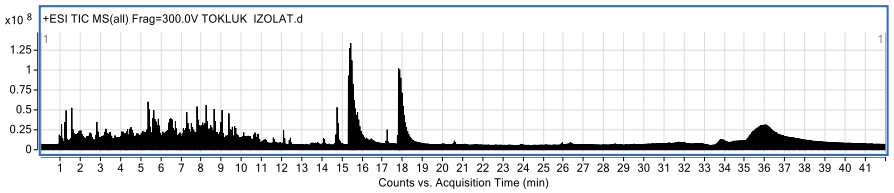
D



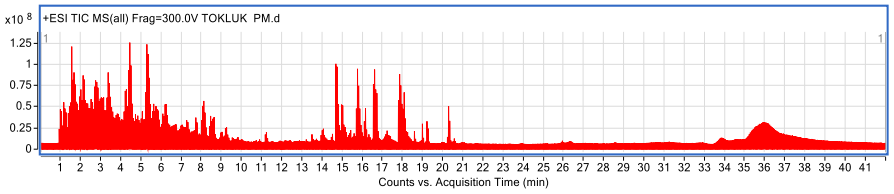
E



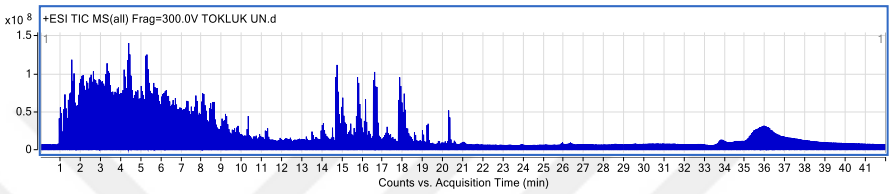
F



G



H



I

Ek 1: Peptitlerin LC/Q-TOF/MS pikleri A: Açlık durumunda izolat, B: Açlık durumunda pişmiş mercimek, C: Açlık durumunda un, D: Tokluk durumunda izolat, E: Tokluk durumunda pişmiş mercimek, F: Tokluk durumunda un, G: Bebek sindirimi izolatı, H: Bebek sindirimi pişmiş mercimek, I: Bebek sindirimi un