

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEAZLARLA
BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ÜRETİMİ VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Fikriye Alev AKÇAY

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ARALIK 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEAZLARLA
BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ÜRETİMİ VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Fikriye Alev AKÇAY

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşe AVCI

ARALIK 2024

Fikriye Alev AKÇAY tarafından hazırlanan “*Bacillus* Suşlarından Elde Edilen Proteazlarla Biyoaktif Peptitlerin Üretimi ve Bazı Özelliklerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 06.12.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

- Jüri Başkanı :** **Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR**
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
- Jüri Üyesi :** **Prof. Dr. Ayşe AVCI** (Danışman)
Sakarya Üniversitesi
- Jüri Üyesi :** **Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR**
Sakarya Üniversitesi
- Jüri Üyesi :** **Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY**
Ankara Üniversitesi
- Jüri Üyesi :** **Dr. Öğr. Üyesi Semra YILMAZER KESKİN**
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “*Bacillus* Suşlarından Elde Edilen Proteazlarla Biyoaktif Peptitlerin Üretimi ve Bazı Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(15/11/2024)

Fikriye Alev AKÇAY





Aileme...



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince akademik ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, beni daima fikir ve önerileriyle doğruya yönlendirmek adına emek sarf eden ve akademik hayatımda hep daha iyi versiyonuma ulaşmamı gerçekten önemseydiğini bildiğim ve ayrıca tüm bu süreçte etik ve ahlak ilkelerinden taviz vermeyen bir araştırmacı olmamda katkısı olan danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Avcı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, araştırma sonuçlarımın periyodik olarak takibi ve değerlendirilmesine katkı sağlayan, tez izleme komite üyesi hocalarım Prof. Dr. Serap Coşansu Akdemir ve Dr. Öğr. Üyesi Semra Yılmazzer Kesin'e emekleri için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın son kısmını Kanada'da tamamlamamı sağlayan ve beni laboratuvarında ziyaretçi araştırmacı olarak konuk eden yurt dışı danışmanım Prof. Dr. Lingyun Chen'e ve Alberta Üniversitesi'ne bana bu fırsatı verdikleri için çok teşekkür ederim. Tüm bu süreçte beni BİDEB 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında 12 ay maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a (Başvuru no: 1059B142201619) teşekkürlerimi sunarım. Yurt dışı görevlendirmemde ayrıca emeği geçen Samin Toupal Tabatabai ve Seyit Tabatabai ile Fehmi Yıldız ve Esra Yıldız'a çok teşekkür ederim. Bununla birlikte, tez çalışmamın bir kısmının gerçekleştirilmesini sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje no: 2021-7-25-25) katkıları için teşekkür ederim.

Ayrıca, Dr. Chen'in laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım Sitian, Esther, Nastaran, Tong, Abouzar, Yifu, Jiayi, Samitha, Peineng, Sabina, Misael, Gisella, Hamy ve benden yardımlarını esirgemeyen Mr. Tian'a sağladıkları sıcak atmosfer için ve tez çalışmamın başlarında aynı laboratuvarı paylaştığımız, kişiliği ve azmi ile her zaman örnek oluşturan Dr. Mohammed Hamk'a ve benim için iş yerinde dostluğu mümkün kılan Dr. Elif Sezer'e destekleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak, varlığı ile hayatıma renk katan afacan kedim Toprak'a ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem, babam ve ablama çok teşekkür ederim.

Fikriye Alev AKÇAY



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xv
SİMGELER	xvii
TABLO LİSTESİ	xix
ŞEKİL LİSTESİ	xxi
ÖZET	xxiii
SUMMARY	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
2.1. Biyoaktif Peptitler	5
2.2. Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonları	6
2.2.1. Antioksidatif etki	6
2.2.2. Antihipertansif etki	7
2.2.3. Antimikrobiyel etki	8
2.2.4. Mineral bağlayıcı etki	9
2.2.5. Bağışıklık sistemini düzenleyici etki	10
2.2.6. Opioid etki	11
2.2.7. Antitrombotik etki	11
2.3. Biyoaktif Peptitlerin Üretim Yöntemleri	12
2.3.1. Enzimatik hidroliz	12
2.3.2. Mikrobiyel fermentasyon	12
2.3.3. Kimyasal sentez	12
2.4. Enzimatik Hidroliz ile BAP Üretimi	13
2.4.1. Proteazlar	14
2.4.2. Proteazların sınıflandırılması	17
2.4.3. Proteinlerin hidrolizi	18
2.4.4. Proteinlerin enzimatik hidrolizine etki eden faktörler	20
2.4.4.1. Proteazın etkisi	20
2.4.4.2. Hidroliz derecesinin etkisi	21
2.4.4.3. Substratın etkisi	22
2.5. Siyez Buğdayı	24
3. BİTKİSEL PROTEİNLERDEN FARKLI PROTEAZLAR İLE BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI	27
3.1. Giriş	27
3.2. Materyal ve Yöntem	28
3.3. Bitkisel Protein Kaynaklarının Hazırlanması	29
3.3.1. Kimyasal kompozisyon analizleri	29
3.3.2. Bitkisel proteinlerin izolasyonu	31
3.4. Protein İzolatlarının Ticari Proteazlar ile Hidrolizi	31

3.4.1. Hidrolizatların antioksidan özelliklerinin belirlenmesi.....	32
3.4.2. Protein ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu	33
3.4.3. Bakteriyel ham proteaz üretimi için mikroorganizma tarama çalışması..	33
3.4.4. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 ile proteaz üretimi ve enzimin özelliklerinin belirlenmesi	34
3.4.4.1. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi	34
3.4.4.2. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	35
3.4.4.3. Enzimin optimum pH ve sıcaklığının belirlenmesi.....	36
3.4.4.4. Ham proteaz üretiminde kullanılan bakteri izolatının tanımlanması	37
3.5. Direkt Hidroliz ile Siyez Protein Hidrolizatlarının Üretimi	37
3.5.1. Hidroliz derecesinin belirlenmesi.....	38
3.5.2. Hidrolize Proteinlerin Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	39
3.5.3. Hidrolizatların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi.....	42
3.5.3.1. DPPH gideriminin belirlenmesi	42
3.5.3.2. ABTS gideriminin belirlenmesi	43
3.5.3.3. Demir (II) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi.....	44
3.5.3.4. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi	45
3.5.4. Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi	46
3.5.4.1. Emülsiyon özelliklerinin belirlenmesi	46
3.5.4.2. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi	46
3.5.4.3. Köpürme özelliklerinin belirlenmesi.....	47
3.5.4.4. Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi	47
3.6. İstatistiksel Analizler	48
3.7. Bulgular ve Tartışma	48
3.7.1. Bitkisel unların kimyasal kompozisyonu	48
3.7.2. Farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi	50
3.7.3. Ticari proteazlar ile üretilen protein hidrolizatların antioksidan aktivitesi	53
3.7.4. Farklı koşullarda elde edilen siyez protein izolatlarının ekstraksiyon verimi	54
3.7.5. Ham proteazın özellikleri	56
3.7.5.1. <i>Bacillus</i> suşunun seçilmesi.....	56
3.7.5.2. Ham proteazların proteolitik aktivitesi.....	57
3.7.5.3. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 proteazının optimum pH ve sıcaklığı	58
3.7.5.4. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 izolatının tanımlanması	61
3.7.6. Direkt hidrolizle elde edilen siyez hidrolizatlarının protein içeriği ve hidroliz derecesi	62
3.7.7. Siyez hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi	63
3.7.7.1. Serbest radikalini giderim aktivitesi.....	63
3.7.7.2. Demir şelatlama.....	65
3.7.7.3. Toplam fenolik madde	67
3.7.8. Teknolojik özellikler	68
3.7.8.1. Emülsifiye edici özellikler	68
3.7.8.2. Yağ tutma kapasitesi	69
3.7.8.3. Köpürme özellikleri.....	70
3.7.9. Fizikokimyasal özellikler	72
3.7.9.1. FTIR spektroskopisi	72
3.7.9.2. Zeta potansiyeli	74
3.7.10. SDS-PAGE ile tanımlama.....	75

4. SİYEZ PROTEİNLERİNDEN *BACILLUS MOJAVENSIS* SP. EBTA7 HAM ENZİMİ İLE BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

.....	77
4.1. Giriş.....	77
4.2. Materyal ve Yöntem.....	78
4.2.1. Siyez proteinlerinin ekstraksiyonu.....	79
4.2.2. Proteaz üretimi ve aktivitesinin belirlenmesi.....	80
4.2.3. Siyez proteinlerinin hidrolizi.....	82
4.2.3.1. Hidroliz derecesinin belirlenmesi.....	82
4.2.3.2. Biyoaktif peptitlerin ultrafiltrasyon ile saflaştırılması.....	83
4.2.4. Hidrolizatların antioksidan özelliklerinin belirlenmesi.....	83
4.2.4.1. DPPH gideriminin belirlenmesi.....	84
4.2.4.2. ABTS gideriminin belirlenmesi.....	87
4.2.4.3. Demir (II) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi.....	89
4.2.4.4. Demir iyonu indirgeyici antioksidan gücün belirlenmesi.....	92
4.2.4.5. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi.....	92
4.2.5. α -Amilaz inhibitör aktivitenin belirlenmesi.....	93
4.2.6. Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi.....	94
4.2.6.1. Emülsiyon özelliklerinin belirlenmesi.....	94
4.2.6.2. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi.....	95
4.2.6.3. Köpürme özelliklerinin belirlenmesi.....	95
4.2.7. Yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi.....	95
4.2.8. Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi.....	96
4.2.9. Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi.....	96
4.2.10. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ileri saflaştırma ve diyaliz.....	97
4.2.11. Proteinlerin tanımlanması.....	98
4.3. İstatistiksel Analizler.....	99
4.4. Bulgular ve Tartışma.....	99
4.4.1. Protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.....	99
4.4.2. Proteaz aktivitesi.....	100
4.4.3. Hidroliz derecesi ve protein içeriği.....	101
4.4.4. Peptit fraksiyonlarının protein içeriği.....	103
4.4.5. Antioksidan aktivite.....	103
4.4.5.1. DPPH giderimi.....	103
4.4.5.2. ABTS giderimi.....	106
4.4.5.3. Demir (II) iyonu şelatlama.....	107
4.4.5.4. Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç.....	109
4.4.5.5. Toplam fenolik madde.....	111
4.4.6. α -Amilaz inhibitör aktivite.....	113
4.4.7. Teknolojik özellikler.....	114
4.4.7.1. Emülsifiye edici özellikler.....	114
4.4.7.2. Yağ tutma kapasitesi.....	116
4.4.7.3. Köpürme özellikleri.....	117
4.4.8. Yüzey hidrofobisite özellikleri.....	119
4.4.9. Fizikokimyasal özellikler.....	120
4.4.9.1. FTIR spektroskopisi.....	120
4.4.9.2. Zeta potansiyeli.....	124
4.4.10. Amino asit kompozisyonu.....	126
4.4.11. Hidrofobik etkileşimle ayırım.....	128
4.4.12. Proteinlerin tanımlanması.....	129

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	131
KAYNAKLAR.....	133
EKLER.....	173
ÖZGEÇMİŞ.....	175



KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
BAP	: Biyoaktif peptit
BSA	: Sığır serum albümini
DF	: Dilüsyon faktörü
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EAI	: Emülsiyon aktivite indeksi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat
ESI	: Emülsiyon stabilite indeksi
FRAP	: Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
GAE	: Gallik asit eş değeri
HD	: Hidroliz derecesi
MA	: Molekül ağırlığı
MWCO	: Molekül ağırlığı ayırma sınırı
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	: Trikloroasetik asit
TFM	: Toplam fenolik madde
YTK	: Yağ tutma kapasitesi



SİMGELER

I	: Küvetin ışık yolu [m]
ϕ	: Yağ hacim fraksiyonu
C	: Sıvı fazdaki protein konsantrasyonu [g/m ³]
$^{\circ}\text{C}$	: Sıcaklık [Celsius]
Da	: Dalton
H_0	: Yüzey hidrofobisitesi
kDa	: Kilodalton



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Katalizlenen tepkime türüne göre enzimlerin sınıflandırılması.	14
Tablo 2.2. Endüstriyel uygulama potansiyeline sahip proteaz üretici bakteriler ve uygulama alanları.	20
Tablo 2.3. Çeşitli gıda işleme yan ürünlerinin proteolitik enzimler ile hidrolizi ve hidrolizatların biyoaktivite özellikleri.	23
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları, firma ve menşei.	29
Tablo 3.2. Bitkisel protein izolatlarının ticari proteazlar ile hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlar.	32
Tablo 3.3. Siyez unundan beş farklı proteaz ile iki farklı E/S oranında üretilen hidrolizatlar.	38
Tablo 3.4. SDS-PAGE jel içeriği.	42
Tablo 3.5. Bitkisel un çeşitlerinin kimyasal bileşen dağılımı.	48
Tablo 3.6. Farklı bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilen protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.	51
Tablo 3.7. Farklı bitkisel proteinlerden ticari proteazlar kullanılarak elde edilen hidrolizatların % DPPH giderim aktivitesi değerleri	53
Tablo 3.8. Farklı pH değerlerinde elde edilen siyez protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.	55
Tablo 3.9. Farklı katı madde/çözgen oranlarında elde edilen siyez protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.	55
Tablo 3.10. <i>Bacillus</i> kolonilerinin şeffaf zon çapı uzunlukları.	57
Tablo 3.11. <i>Bacillus</i> izolatları tarafından üretilen ham proteazların toplam protein içeriği ve proteolitik aktivite değerleri.	57
Tablo 3.12. Siyez hidrolizatlarının DPPH ve ABTS radikallerini giderim aktivitesi.	64
Tablo 3.13. Siyez hidrolizatlarının demir şelatlama aktivitesi.	66
Tablo 3.14. Siyez hidrolizatlarının toplam fenolik madde içeriği.	67
Tablo 3.15. Siyez hidrolizatlarının emülsiyon aktivite ve emülsiyon stabilite indeksi.	68
Tablo 3.16. Siyez hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi.	69
Tablo 3.17. Siyez hidrolizatlarının köpük genişmesi ve stabilitesi.	70
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları, firma ve menşei.	79
Tablo 4.2. Siyez unu, protein izolatu ve ham proteazın kuru madde ve toplam protein içeriği.	99
Tablo 4.3. Ham proteazın protez aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri.	100
Tablo 4.4. Siyez protein izolatu, hidrolizatı ve peptit fraksiyonlarının toplam protein içeriği.	103
Tablo 4.5. Siyez protein izolatu, hidrolizatı, peptit fraksiyonları ve troloksun DPPH giderimi IC50 değerleri.	104
Tablo 4.6. Bitkisel protein hidrolizatlarının DPPH giderim aktivitesi IC50 değerleri.	105

Tablo 4.7. Siyez protein izolatu, hidrolizatu, peptit fraksiyonlari ve troloksun ABTS giderimi IC50 değerleri.	106
Tablo 4.8. Siyez protein izolatu, hidrolizatu, peptit fraksiyonlari ve EDTA'nın demir (II) iyonu şelatlama IC50 değerleri.	108
Tablo 4.9. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının demir iyonu indirgeyici antioksidan gũç değerleri.	110
Tablo 4.10. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının toplam fenolik madde iğeriği.	111
Tablo 4.11. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının α -amilaz inhibitör aktivitesi.	113
Tablo 4.12. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının emũlsiyon aktivite ve emũlsiyon stabilite indeksi.	115
Tablo 4.13. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının yağ tutma kapasitesi.	116
Tablo 4.14. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının kœpũk genleşmesi ve stabilitesi.	118
Tablo 4.15. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının FTIR spektroskopisi ile elde edilen absorbans pikleri ve bu piklere atanmış titreşim tũrleri.	121
Tablo 4.16. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının zeta potansiyeli değerleri.	125
Tablo 4.17. Siyez unu, siyez protein izolatu ve MA > 10 kDa peptit fraksiyonunun toplam amino asit kompozisyonu.	126
Tablo 4.18. MA > 10 kDa, F-1 ve F-2 fraksiyonlarının protein tũrũ ve molekũler bũyũklũęũ dağılımı.	130

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Proteazların sınıflandırılması.....	18
Şekil 3.1. Tirozin standart eğrisi.....	35
Şekil 3.2. BSA standart eğrisi.....	36
Şekil 3.3. BSA standart eğrisi.....	39
Şekil 3.4. Troloks standart eğrisi (DPPH).....	43
Şekil 3.5. Troloks standart eğrisi (ABTS).....	44
Şekil 3.6. EDTA standart eğrisi.....	45
Şekil 3.7. Gallik asit standart eğrisi.....	46
Şekil 3.8. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 tarafından üretilen ham proteazın farklı pH ve sıcaklıkta elde edilen proteaz aktivitesi değerleri. a) 50 °C b) 60 °C c) 70 °C d) 80 °C.....	59
Şekil 3.9. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 tarafından üretilen ham enzimin proteaz aktivitesinin pH ve sıcaklığa bağlı değişim grafiği.....	60
Şekil 3.10. Proteaz bağıl aktivitesinin farklı tepkime koşullarında değişim grafiği a) pH, b) Sıcaklık.....	61
Şekil 3.11. <i>Bacillus</i> sp. EBTA7 bakterisine ait 16S rDNA gen dizi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.....	62
Şekil 3.12. Farklı proteazlar kullanılarak iki farklı enzim/substrat oranında elde edilen siyez unu hidrolizatlarının hidroliz derecesi ve protein içeriği.....	62
Şekil 3.13. Siyez hidrolizatlarının FTIR spektrumu.....	73
Şekil 3.14. Ticari enzimler ile üretilen hidrolizatların zeta potansiyeli grafiği.....	75
Şekil 3.15. Siyez hidrolizatlarının SDS-PAGE profili.....	76
Şekil 4.1. Tirozin standart eğrisi.....	81
Şekil 4.2. BSA standart eğrisi.....	82
Şekil 4.3. BSA standart eğrisi.....	83
Şekil 4.4. Değişen örnek konsantrasyonu için DPPH % giderim grafiği. a) Troloks b) Siyez protein izolatu c) Siyez protein hidrolizatu d) $MA \leq 1$ kDa peptit fraksiyonu e) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu f) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu g) $MA > 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu.....	85
Şekil 4.5. Değişen örnek konsantrasyonu için ABTS % giderim grafiği. a) Troloks b) Siyez protein izolatu c) Siyez protein hidrolizatu d) $MA \leq 1 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu e) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu f) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu g) $MA > 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu.....	88
Şekil 4.6. Değişen örnek konsantrasyonu için % metal şelatlama aktivitesi grafiği. a) EDTA b) Siyez protein hidrolizatu c) $MA \leq 1 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu d) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu e) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu f) $MA > 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu.....	90
Şekil 4.7. Askorbik asit standart eğrisi.....	92
Şekil 4.8. Gallik asit standart eğrisi.....	93
Şekil 4.9. Akarboz standart eğrisi.....	94

Şekil 4.10. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının absorbands spektrumu.	98
Şekil 4.11. Ham proteazın değişen konsantrasyonlarına bağlı elde edilen proteaz aktivitesi eğrisi.	101
Şekil 4.12. Ham proteaz ile farklı E/S oranında (h/h) üretilen siyez protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi ve protein içeriği. Üretim koşulları: 60 °C, pH 9, 5 saat. Proteaz aktivitesi: 2056 U/mL.	101
Şekil 4.13. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının antioksidan güç grafiği.	110
Şekil 4.14. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının TFM grafiği.	112
Şekil 4.15. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının yüzey hidrofobisitesi.....	119
Şekil 4.16. FTIR spektrumu: a) $MA \leq 1$ kDa b) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa c) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa d) $MA > 10$ kDa e) Siyez protein hidrolizatu f) Siyez protein izolatu.	123
Şekil 4.17. $MA > 10$ kDa fraksiyonunun hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ayrımı sonucu elde edilen kromatogram.....	129

BACILLUS SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEAZLARLA BİYOAKTİF PEPTİTLERİN ÜRETİMİ VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada bitkisel proteinlerden enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptit (BAP) üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde, altı farklı bitkisel ürünün [siyez unu, kuru fasulye unu, sarı mercimek unu, karabuğday, beyaz kinoa ve Galya kavunu (çekirdek kısmı)] biyoaktif özellikte hidrolizat üretiminde protein öncülü olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Bitkisel protein isolatları alkali solvent yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve dört farklı ticari proteaz (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, rTrypsin) ile uygun proteolitik tepkime koşullarında (50 °C, pH 7) hidroliz edilmiştir (%5 E/S h/h, 2 sa). Protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi DPPH giderimi ile belirlenmiştir. İzolatların protein içeriği %24,7 (karabuğday) ve %76,7 (sarı mercimek), ekstraksiyon verimi %3,6 (karabuğday) ve %36,2 (sarı mercimek) arasında belirlenmiştir. Alcalase ve Flavourzyme ile daha fazla DPPH giderimi elde edilmiş, altı farklı bitkisel protein kaynağı arasında siyez protein hidrolizatları en yüksek aktiviteyi sergilemiştir (%30-73). Buna göre çalışmanın devamında BAP üretimi için siyez unu protein kaynağı olarak seçilmiştir.

Siyez proteinlerinin ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla pH (8-10) ve katı madde/çözgen oranının (%10-30 a/h) etkisi incelenmiştir. Buna göre pH 10 ve %10 koşulları optimum olarak belirlenmiştir (ekstraksiyon verimi: ~%23). Ayrıca, bakteriyel ham proteaz ile BAP üretilmiştir. Proteaz üretici bakteri izolatının seçilmesi için mikroorganizma tarama çalışması gerçekleştirilerek izolatların proteaz üretim yeteneği incelenmiştir. Bunun için sekiz farklı *Bacillus* suşunun süt tozu içeren katı besiyerinde proteolitik aktivitesi değerlendirilmiştir. *Bacillus* sp. EBTA7 suşundan elde edilen ham proteazın proteolitik aktivitesi en yüksek olmuştur. Seçilen bu suş için proteaz aktivitesi koşulları optimize edilmiş ve bunun için farklı pH (7-11) ve sıcaklık (50-80 °C) değerlerinde aktivite gerçekleştirilmiştir. Buna göre 60 °C ve pH 9 optimum aktivite koşulları olarak seçilmiştir (2056 U/mL). Seçilen *Bacillus* sp. suşu moleküler tanımlama sonucunda *Bacillus mojavensis* ile %99,86 oranında benzerlik göstermiştir.

Çalışmanın devamında siyez unu ticari proteazlar (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, rTrypsin) ve *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 ham proteazı ile hidroliz edilmiştir. Hidroliz tüm proteazlar için iki farklı E/S oranında (h/a) gerçekleştirilmiştir (ticari proteazlar: %0,25 ve 1; ham proteaz: %50 ve 100). Hidroliz derecesi (HD) %6,0-35,6 arasında belirlenmiş, ham enzim için E/S oranındaki artışın HD'yi iyileştirdiği tespit edilmiştir. Proteinlerin SDS-PAGE profili genel olarak hidroliz derecesi bulgularıyla örtüşmüştür. Hidrolizatların biyoaktivitesi serbest radikallerin (DPPH ve ABTS) giderimi, demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi ve toplam fenolik madde (TFM) içeriğinin incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Hidrolizatların DPPH giderimi 17,7 ile 33,0 µmol troloks eş değeri (TE)/g, ABTS giderimi 107-190 µmol TE/g arasındadır. Demir şelatlama aktivitesi 0,09-3,08 mg EDTA/g, TFM miktarı 6,94-14,98 mg gallik asit eş değeri/g arasındadır. Ayrıca, hidrolizatların bazı teknofonksiyonel özellikleri

incelenmiş, bunun için emülsiyon aktivite indeksi (EAI), emülsiyon stabilite indeksi (ESI), yağ tutma kapasitesi (YTK) ve köpürme özellikleri belirlenmiştir. Buna göre EAI 28-61 m²/g, ESI 11-227 dk, YTK 0,70-2,94 g/g, köpük genleşmesi %27-84 ve köpük stabilitesi %22-94 arasındadır. FTIR spektroskopisi ticari proteaz hidrolizatlarının ikincil yapısının ağırlıklı olarak β -plaka, ham proteaz hidrolizatlarının α -heliks olduğuna işaret etmiştir. Hidrolizatların zeta potansiyeli dağılımı -20,0 mV ile -3,19 mV arasında olup ham proteaz hidrolizatlarının zeta potansiyeli en yüksektir (-20 mV). Tüm hidrolizatların yüksek antioksidan kapasitede olduğu belirlenmiş, bununla birlikte *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 hidrolizatları çok daha yüksek YTK, emülsiyon ve köpük stabilitesi sergilemiştir.

Çalışmanın son bölümünde, siyez protein izolatu (SPI) ve ham proteaz ilk bölümde tespit edilen optimum üretim koşullarında ve yüksek kapasitede üretilmiştir. BAP üretimi ham proteaz ile gerçekleştirilmiş, substrat olarak SPI (%67 protein) protein içeriği %5 olacak şekilde tampon çözeltide hazırlanmıştır (100 mM, pH 9). Hidroliz öncesi liyofilize ham proteaz 2056 U/mL aktivite değerine ayarlanmış ve hidroliz üç farklı E/S oranında (%30, 40 ve 50) gerçekleştirilmiştir (60 °C, 5 sa). Hidrolitik tepkime ortamı santrifüj edilerek sıvı üst faz toplanmış ve liyofilize edilmiş, ardından kurutulmuş hidrolizatların HD değeri belirlenmiştir. Buna göre %50 E/S ile istenilen HD değeri elde edilmiş (%19,9) ve çalışmanın devamında hidroliz bu oranda gerçekleştirilerek siyez protein hidrolizatı (SPH) aynı şekilde elde edilmiştir. Hidrolizat, farklı gözenek çapındaki (10 kDa, 5 kDa, 1 kDa) membranların kullanıldığı ultrafiltrasyon sisteminden geçirilerek moleküler ağırlığına (MA) göre ayrılmış ve ≤ 1 kDa, 1-5 kDa, 5-10 kDa ve > 10 kDa olmak üzere dört peptit fraksiyonu elde edilmiştir. MA fraksiyonlarının antioksidan ve antidiyabetik özellikleri *in vitro* spektrofotometrik analizler ile belirlenmiş ve %50 inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀) hesaplanmıştır. Ayrıca, fraksiyonların teknofonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. Yüzey hidrofobisitesi (H₀) ve amino asit kompozisyonu ile birincil yapı özellikleri, FTIR ve zeta potansiyeli ile ikincil yapı özellikleri ortaya konmuştur. Son olarak, MA > 10 kDa fraksiyonu hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) ile saflaştırılmıştır.

Ultrafiltrasyon (UF) ile elde edilen peptit fraksiyonlarının protein içeriği %43,4-81,7 arasındadır. IC₅₀ değerleri DPPH giderimi için 15,0-88,3 mg/mL, ABTS için 3,9-4,5 mg/mL ve demir (II) şelatlama için 0,17-0,34 mg/mL arasında belirlenmiştir. DPPH gideriminde peptit MA'sı ile aktivite arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiş, MA > 10 kDa ile en yüksek aktivite elde edilmiştir. ABTS giderimi için UF uygulamasının aktivite üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığı gözlenmiştir. Demir (II) şelatlama kapasitesinin küçük boyutlu peptit fraksiyonları için (≤ 1 kDa ve 1-5 kDa) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç peptit konsantrasyonuna bağlı lineer olarak artmış ve hidroliz sonucunda zayıflamış, UF uygulaması ile (> 10 kDa için) önemli ölçüde iyileşmiştir. Hidroliz işlemi proteinlerin TFM içeriğini zenginleştirmiştir. Bununla birlikte TFM tüm fraksiyonlar için benzer düzeyde tespit edilmiştir. Fraksiyonların antidiyabetik özelliği α -amilaz inhibitör aktivitesi ile incelenmiş ve dikkate değer bir inhibitör aktiviteye rastlanmamıştır. Fraksiyonlar için EAI 5,3-29,3 m²/g, ESI 15,2-27,0 dk, YTK 0,32-9,21 g/g, köpük genleşmesi %11-77 ve köpük stabilitesi %1-87 aralığında tespit edilmiştir. MA > 10 kDa fraksiyonu EAI, YTK ve köpürme genleşmesi ve stabilitesi açısından en iyi fraksiyon olarak belirlenmiştir. MA > 10 kDa için H₀ değeri diğer fraksiyonlara kıyasla oldukça yüksek olup, bu durum amino asit kompozisyonun belirlenmesi sonucu bu fraksiyonun zengin hidrofobik amino asit içeriği ile doğrulanmıştır. FTIR spektrumu ile ikincil yapısı α -heliks belirlenen siyez proteinlerinin hidroliz sonrası bu

yapısının korunduğu gözlenmiştir. UF ile elde edilen MA fraksiyonlarının ikincil yapısı ise > 5 kDa için ağırlıklı olarak α -heliks, < 5 kDa için β -plaka olarak belirlenmiştir. Peptit fraksiyonlarının zeta potansiyeli -14,1 ile -27,7 mV arasında tespit edilmiştir. Toplam amino asit kompozisyonunun belirlenmesiyle hidroliz ve UF uygulaması sonrası hidrofilik ve hidrofobik amino asitlerin sayısının arttığı ve daha çok hidrofilik özellikteki amino asitlerin açığa çıktığı gözlenmiştir. Asp, Glu, Ser, Gly, Tyr, Trp, Leu ve Lys miktarı MA > 10 kDa fraksiyonunda yüksek tespit edilmiş ve bu fraksiyonun Met hariç bütün esansiyel amino asitleri içerdiği belirlenmiştir. MA > 10 kDa fraksiyonunun HEK ile saflaştırılması sonucunda iki farklı hidrofobik karakterde ileri fraksiyon elde edilmiştir. İleri fraksiyonların kütle spektrometresi analizi sonucu içeriğinde yüksek molekül ağırlıklı glütenin (88 kDa) proteinlerine rastlanmıştır. Özetle, çalışmanın ikinci bölümünde laboratuvar ortamında üretilen ham proteazın enzimatik hidroliz ile BAP üretiminde kullanılabilirliği gösterilmiş, elde edilen peptit fraksiyonlarının genel olarak gelişmiş antioksidan özellikte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ultrasltrasyon işleminin peptit antioksidan ve fonksiyonel özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çeşitli bitkisel proteinlerden BAP üretiminin gerçekleştirildiği bu çalışmada siyez proteinlerinin enzimatik hidroliz ile biyoaktif ve teknofonksiyonel özelliklerinin yüksek ölçüde iyileştirildiği belirlenmiştir.



PRODUCTION OF BIOACTIVE PEPTIDES BY USING THE PROTEASES OBTAINED FROM *BACILLUS* STRAINS AND INVESTIGATION OF SOME PROPERTIES OF THE BIOACTIVE PEPTIDES

SUMMARY

In this study, bioactive peptide (BAP) production from plant-based proteins was carried out through enzymatic hydrolysis. In the first part of the study, the potential use of six different plant products [einkorn flour, dry bean flour, yellow lentil flour, buckwheat, white quinoa, and Galia melon (seed part)] as protein precursors for producing bioactive hydrolysates was determined. Plant protein isolates were extracted using the alkaline solvent method and hydrolyzed under suitable proteolytic reaction conditions (50 °C, pH 7) with four different commercial proteases (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, rTrypsin) at a 5% E/S ratio (v/v, 2 h). The antioxidant activity of the protein hydrolysates was determined by DPPH scavenging. The protein content of the isolates was found to range from 24.7% (buckwheat) to 76.7% (yellow lentil), and the extraction yield ranged from 3.6% (buckwheat) to 36.2% (yellow lentil). The highest DPPH scavenging was obtained with Alcalase and Flavourzyme, and among the six different plant protein sources, einkorn protein hydrolysates exhibited the highest activity (30-73%). Based on these results, einkorn flour was chosen as the protein source for BAP production in the continuation of the study.

To increase the extraction yield of einkorn proteins, the effect of pH (8-10) and solid-to-solvent ratio (%10-30 w/v) was investigated. Accordingly, pH 10 and 10% solid content were determined as the optimal conditions (extraction yield: ~23%). Additionally, BAP was produced using bacterial crude protease. A microorganism screening study was conducted to select the protease-producing bacterial isolate, and the protease production ability of the isolates was examined. For this, the proteolytic activity of eight different *Bacillus* strains was evaluated on a solid medium containing milk powder. The highest proteolytic activity was observed with crude protease obtained from *Bacillus* sp. EBTA7 strain. The protease activity conditions for this selected strain were optimized, and the activity was tested under different pH (7-11) and temperature (50-80 °C) values. The optimum conditions were determined to be 60 °C and pH 9 (2056 U/mL). The selected *Bacillus* sp. strain was identified as *Bacillus mojavensis* based on molecular identification, with 99.86% similarity.

In the continuation of the study, einkorn flour was hydrolyzed with commercial proteases (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, rTrypsin) and *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 crude protease. Hydrolysis was performed for all proteases at two different E/S ratios (w/v) (commercial proteases: 0.25% and 1%; crude protease: 50% and 100%). The degree of hydrolysis (DH) was determined to range from 6.0% to 35.6%, and it was found that increasing the E/S ratio for crude enzyme improved the DH. The SDS-PAGE profile of the proteins generally matched the DH findings. The bioactivity of the hydrolysates was evaluated by measuring the scavenging of free radicals (DPPH and ABTS), iron (II) ion chelation activity, and total phenolic content (TPC). The DPPH scavenging activity of the hydrolysates ranged from 17.7 to 33.0 µmol Trolox

equivalent (TE)/g, and ABTS scavenging activity ranged from 107 to 190 $\mu\text{mol TE/g}$. The iron chelation activity was between 0.09 and 3.08 mg EDTA/g, and the TPC was found to be between 6.94 and 14.98 mg gallic acid equivalent/g. Additionally, some techno-functional properties of the hydrolysates were examined, including emulsion activity index (EAI), emulsion stability index (ESI), oil binding capacity (OBC), and foaming properties. The EAI ranged from 28 to 61 m^2/g , ESI from 11 to 227 minutes, OBC from 0.70 to 2.94 g/g, foam expansion from 27% to 84%, and foam stability from 22% to 94%. FTIR spectroscopy indicated that the secondary structure of the commercial protease hydrolysates was predominantly β -sheet, while the crude protease hydrolysates exhibited an α -helix structure. The zeta potential of the hydrolysates ranged from -20.0 mV to -3.19 mV, with the crude protease hydrolysates having the highest zeta potential (-20 mV). All hydrolysates were found to have high antioxidant capacity, with *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 hydrolysates demonstrating significantly higher OBC, emulsion, and foam stability.

In the final part of the study, einkorn protein isolate (EPI) and crude protease were produced under the optimum conditions identified in the first part and in high capacity. BAP production was carried out with crude protease, and EPI with 67% protein content was prepared at a 5% concentration in a buffer solution (100 mM, pH 9). Prior to hydrolysis, the lyophilized crude protease was adjusted to an activity value of 2056 U/mL, and hydrolysis was performed at three different E/S ratios (30%, 40%, and 50%) at 60°C for 5 hours. The hydrolytic reaction mixture was centrifuged, and the supernatant was collected, lyophilized, and the DH value of the dried hydrolysate was determined. The desired DH value of 19.9% was obtained at the 50% E/S ratio, and in the continuation of the study, hydrolysis was performed at this ratio to obtain the einkorn protein hydrolysate (EPH) in the same manner. The hydrolysate was separated into four peptide fractions (≤ 1 kDa, 1-5 kDa, 5-10 kDa, and > 10 kDa) using an ultrafiltration system with membranes of different pore sizes (10 kDa, 5 kDa, 1 kDa). The antioxidant and anti-diabetic properties of the molecular weight (MW) fractions were determined through *in vitro* spectrophotometric analyses, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. Additionally, the techno-functional properties of the fractions were evaluated. The primary structure was determined through surface hydrophobicity (H_0) and amino acid composition, while the secondary structure was determined through FTIR and zeta potential analyses. Finally, the MW > 10 kDa fraction was further purified by hydrophobic interaction chromatography (HIC).

The peptide fractions obtained through ultrafiltration (UF) had protein contents ranging from 43.4% to 81.7%. The IC₅₀ values for DPPH scavenging ranged from 15.0 to 88.3 mg/mL, for ABTS from 3.9 to 4.5 mg/mL, and for iron (II) chelation from 0.17 to 0.34 mg/mL. A positive correlation was found between the activity and peptide MW for DPPH scavenging, with the highest activity observed for the MW > 10 kDa fraction. For ABTS scavenging, UF application did not significantly affect the activity. It was found that smaller peptide fractions (≤ 1 kDa and 1-5 kDa) had higher iron (II) chelation capacities. The reducing antioxidant power for iron ions increased linearly with peptide concentration and weakened after hydrolysis, but significantly improved with UF application (> 10 kDa). The hydrolysis process enriched the TPC content of the proteins, with similar levels of TPC found across all fractions. The anti-diabetic properties of the fractions were investigated through α -amylase inhibition, with no significant inhibitory activity observed. The EAI for the fractions ranged from 5.3 to 29.3 m^2/g , ESI from 15.2 to 27.0 minutes, OBC from 0.32 to 9.21 g/g, foam expansion from 11% to 77%, and foam stability from 1% to 87%. The MW > 10 kDa fraction

was identified as the best fraction in terms of EAI, OBC, foam expansion, and stability. The H_0 value of the MW > 10 kDa fraction was significantly higher than the other fractions, which was confirmed by its rich hydrophobic amino acid composition. FTIR spectra showed that the secondary structure of einkorn proteins was maintained after hydrolysis, with the MW > 10 kDa fraction exhibiting α -helix and the < 5 kDa fractions exhibiting β -sheet structures. The zeta potential of the peptide fractions ranged from -14.1 to -27.7 mV. Analysis of the total amino acid composition revealed that after hydrolysis and UF treatment, the number of hydrophilic and hydrophobic amino acids increased, with more hydrophilic amino acids being exposed. The MW > 10 kDa fraction was found to contain all essential amino acids except methionine. Further purification of the MW > 10 kDa fraction by HIC resulted in two advanced fractions with distinct hydrophobic characteristics. Mass spectrometry analysis of these advanced fractions revealed high molecular weight glutenin (88 kDa) proteins. In summary, the second part of the study demonstrated the feasibility of using crude protease produced in the laboratory for enzymatic hydrolysis in BAP production. The peptide fractions obtained were generally found to exhibit enhanced antioxidant properties. Furthermore, ultrafiltration was shown to improve the antioxidant and functional properties of the peptides. In conclusion, this study successfully produced BAPs from various plant-based proteins and determined that the enzymatic hydrolysis of einkorn proteins significantly improved their bioactive and techno-functional properties.



1. GİRİŞ

Biyoaktif peptitler (BAP), sağlık üzerindeki olumlu etkileriyle son yıllarda araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Fitzgerald ve Murray, 2006). Bu peptitler, proteinlerin hidrolizi sonucunda açığa çıkan kısa amino asit zincirlerinden oluşmakta ve çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir (Kitts ve Weiler, 2003). Günümüzde 5000'in üzerinde BAP türü tanımlanmış olup, son yirmi yılda BAP'ların antihipertansif, antioksidatif, antimikrobiyel ve bağışıklık sistemi düzenleyici etkileri üzerine kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Fitzgerald ve Murray, 2006; Minkiewicz ve ark, 2019; Sarmadi ve Ismail, 2010; Udenigwe ve Aluko, 2012).

BAP'ların farklı gıda kaynaklarından üretilebileceği ve bu kaynakların genellikle süt, tahıl, deniz ürünleri, baklagiller gibi protein bakımından zengin gıdalar olduğu bilinmektedir (Pihlanto-Leppälä, 2000; Zhang ve ark, 2012). Örneğin, deniz ürünlerinden, tahıllardan ve baklagillerden elde edilen peptitlerin antioksidatif etkiler sergilediği, bu sayede oksidatif stresle bağlantılı hastalıkların gelişimini önlemede etkili olabileceği gösterilmiştir (Bougatef ve ark, 2010; Wu ve ark, 2017). Benzer şekilde, fermente süt ürünlerinden elde edilen antihipertansif peptitlerin, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyonu yoluyla kan basıncını düşürdüğü kanıtlanmıştır (Erdmann ve ark, 2008; Simonetti ve ark, 2017).

Günümüzde BAP eldesi için farklı yöntemler kullanılmakta olup sindirim enzimleri, proteolitik mikroorganizmalar veya bitkisel kaynaklı proteazlar yardımıyla gerçekleştirilen enzimatik hidroliz, en yaygın kullanılan yöntemdir (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Kimyasal sentez ve rekombinant DNA teknolojisi gibi diğer yöntemler de BAP üretiminde kullanılabilmektedir. Ancak enzimatik hidroliz, düşük maliyetli, çevre dostu ve yüksek verimli bir uygulama olması nedeniyle diğer yöntemlere kıyasla daha fazla tercih edilmekte ve kontrollü koşullar altında peptitlerin biyolojik aktivitelerini optimize etmeyi sağlamaktadır (Daliri ve ark, 2017; Erdmann ve ark, 2008; Kim ve Wijesekara, 2010). Bu süreçte kullanılan enzimler arasında pepsin, tripsin, kimotripsin gibi gastrointestinal enzimler ile mikrobiyel veya hayvansal kaynaklı proteazlar yer almaktadır (Fruton, 1976; Matsui ve ark, 2002).

Bakteriyel proteazlar, biyoteknolojide, gıda endüstrisinde ve BAP üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu proteazlar, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif olabilir, bu da onları endüstriyel uygulamalar için ideal hale getirmektedir (Balakrishnan ve ark, 2012). Bakteriyel proteazlar arasında serin proteazlar, alkali proteazlar ve metalloproteazlar en yaygın olarak kullanılan türlerdir (Tavano, 2013). *Bacillus* türleri, yüksek verimle proteaz üretme kapasitesine sahip oldukları için BAP eldesinde sıklıkla kullanılmaktadır. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi türlerden elde edilen proteazlar, hem endüstriyel hem de biyoteknolojik uygulamalar için uygundur (Gupta ve Ramnani, 2006). *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen Alcalase, genellikle proteinlerin yüksek verimle hidrolizi için tercih edilmekte olup özellikle ADE inhibitör ve antioksidatif peptitlerin üretiminde etkili olduğu bildirilmiştir (Mora ve ark, 2014). Benzer şekilde, *Bacillus amyloliquefaciens*'ten elde edilen Neutrase, daha kısa zincirli peptitlerin üretiminde kullanılmakta ve antioksidatif aktivite gösteren peptitlerin eldesinde başarılı sonuçlar vermektedir (Lassoued ve ark, 2015). *Bacillus* türlerinden elde edilen proteazların, tahıl ve baklagil proteinlerinden antioksidatif ve ADE inhibitör peptitlerin üretiminde kullanımı yaygın bir yaklaşımdır (Rubak ve ark, 2019).

Son yıllarda, bitkisel protein kaynaklarının BAP üretiminde kullanımı yaygınlaşmış ve çeşitli tahıllar, baklagiller ve yan ürünlerden elde edilen peptitlerin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır (Zarei ve ark, 2012). Özellikle bitkisel kaynaklı proteinlerin BAP üretiminde substrat olarak değerlendirilmesi, çevresel sürdürülebilirlik ve ekonomik kazanç açısından önem taşımaktadır (Daliri ve ark, 2017). Siyez buğdayı gibi antik tahıllar, besin değerleri ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Hidalgo ve Brandolini, 2014). Bununla birlikte, siyez proteinlerinden elde edilebilecek BAP'lar üzerine literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Di Stasio ve ark, 2020). Siyez buğdayının diğer buğday türlerine kıyasla yüksek protein içeriği ve zengin esansiyel amino asit profili, BAP üretimi için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır (Abdel-Aal ve Hucl, 2002; Zaharieva ve Monneveux, 2014).

Bu tez çalışması, siyez buğdayının BAP üretimindeki potansiyelini ortaya koymayı ve elde edilen peptitlerin sağlık üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Çalışma, siyez buğdayının yanı sıra diğer protein kaynaklarından da BAP üretimine

yönelik kapsamlı bir analiz sunarak, katma değeri yüksek fonksiyonel bileşiklerin geliştirilmesine katkı sağlamayı hedeflemektedir.

Tezin hipotezi aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

- I. Siyez buğdayı proteini, enzimatik hidroliz ile elde edilen biyoaktif peptitlerin üretimi için uygun bir substrattır.
- II. Siyez proteinlerinden elde edilen peptitler, antioksidatif, antihipertansif ve immünomodülatör gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler.
- III. Siyez proteinlerinden elde edilen peptitler gelişmiş teknofonksiyonel özellikler gösterir.
- IV. *Bacillus* kaynaklı proteazların, ham enzim formunda kullanımı, siyez proteininin hidrolizinde yüksek verimli ve fonksiyonel peptitlerin eldesini destekler.
- V. Siyez buğdayından üretilen biyoaktif peptitler, katma değerli fonksiyonel gıda bileşenleri geliştirilmesine katkı sağlar.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif bileşikler doğada bulunan, besin zincirinin bir parçası olan ve insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri kanıtlanmış polifenoller gibi temel ve temel olmayan (besin ve besin dışı) bileşiklerdir (Biesalski ve ark, 2009; Kris-Etherton ve ark, 2002). Biyoaktif peptitler (BAP) ise vücut fonksiyonları ve sağlık üzerine olumlu etkisi bulunan spesifik protein parçalarıdır (Kitts ve Weiler, 2003). Tanım olarak BAP'lar, proteinlerin *in vivo* veya *in vitro* hidrolizi sonucu elde edilen ve bazı özel biyolojik ve fizyolojik etkilere sahip olan, genellikle 2-20 amino asitten oluşan kısa zincirli peptitlerdir. Kısa zincirli yapıları sayesinde BAP'lar kendilerine özgü bazı fonksiyonel özelliklere sahiptir (Aluko ve Monu, 2003; Haque ve ark, 2008).

BAP'lar ilk kez 1979 yılında tespit edilmiştir ve prokaryotlardan insanlara uzanan geniş bir canlı grubu tarafından sentezlenmektedir. Bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve bunların ürünleri, sahip oldukları kompleks protein yapıları sebebiyle başlıca BAP kaynağı konumundadır. Gıdalar orijini fark etmeksizin (bitkisel, hayvansal, deniz ürünü vb.) çok sayıda BAP bulundurmakla birlikte süt ve tahıl ürünleri BAP eldesinde en önemli gıda kaynaklarıdır (Möller ve ark, 2008; Pihlanto-Leppälä, 2000; Sariakçalı, 2019; Şanlıdere-Aloğlu, 2010; Ünal ve ark, 2018).

Günümüzde, beş bin adet üzerinde farklı BAP türü bilimsel araştırmalar neticesinde tanımlanmış durumdadır. Çevrimiçi BAP veri tabanlarından StraPep tanımlanmış 3791 adet (StraPep, 2024; Wang ve ark, 2018); BIOPEP-UWM 5098 adet (Minkiewicz ve ark, 2019) BAP türünün kayıtlı olduğunu bildirmektedir. BAP'lar, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin kanıtlanmasıyla son çeyrek asırdır bilimsel araştırmaların odağındadır (Fitzgerald ve Murray, 2006).

Biyoaktif peptitler doğal kaynağında serbest halde bulunmakla birlikte bilinen BAP'ların çoğu ebeveyn (asıl) protein sekansında şifrelenmiş ve inaktif (pasif) halde bulunmaktadır. BAP'ların aktif hale geçmesi, diğer bir ifade ile salınımı üç farklı şekilde gerçekleşmektedir:

- Sindirim sistemi (gastrointestinal sistem) enzimleri ile sindirim esnasında,

- Proteolitik mikroorganizmalar/starter kültürler aracılığı ile fermantasyon sırasında,
- Mikrobiyel veya bitkisel kaynaklı proteazlar tarafından hidroliz ile (Korhonen ve Pihlanto, 2003).

Peptitler vücutta metabolizma faaliyetleri ve gıdalarda fermantasyon sonucunda aktif hale geçerken hepsinin ortak mekanizması enzimatik faaliyettir (Gauthier ve ark, 2006; Udenigwe, 2014). Bununla birlikte, kimyasal yöntemlerle doğal ve sentetik yapıda BAP üretimi de mümkündür. Buna karşın kimyasal üretimde maliyetin yüksek olması, uzun zincirli peptit üretiminde yaşanan birtakım zorluklar ile çevre ve canlılar için tehlikeli ve zararlı kimyasalların kullanımı bu yöntemin dezavantajlarıdır (Agyei ve Danquah, 2011; Aluko, 2008). Ayrıca, kimyasal üretimde zehirli yapıdaki bileşiklerin son ürüne geçiş riski bulunmaktadır (Zambrowicz ve ark, 2013). Bu sebeplerle yüksek verimli, çevre dostu ve ekonomik bir uygulama olan enzimatik yöntemler ile BAP üretimine ilgi son yıllarda artmıştır (Hafeez ve ark, 2014; Kim ve Wijesekara, 2010).

2.2. Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonları

BAP'lar amino asit içeriği ve zincir dizilimine bağlı olarak farklı fonksiyonel özellikler taşımakta ve biyolojik işlevlerine bağlı olarak vücutta farklı bölgeleri etkilemektedir (Hernández-Ledesma ve ark, 2011; Sirtori ve ark, 2009). Kalp-damar sistemi (kardiyovasküler sistem) üzerinde etkili olanlar: antihipertansif, antioksidatif, antitrombotik, hipokolesterolemik; sinir sistemi üzerinde etkili olanlar: opioid, agonistik, antagonistik; gastrointestinal sistem üzerinde etkili olanlar: mineral bağlayıcılar, iştah kesiciler, antimikrobiyeller ve bağışıklık sistemi üzerinde etkili olanlar: sitomodülatörler, immünomodülatörler ve antimikrobiyel peptitlerdir (Najafian ve Babji, 2014; Sarmadi ve Ismail, 2010; Udenigwe ve Aluko, 2012).

2.2.1. Antioksidatif etki

Oksidatif stres, canlılarda hücreleri tahrip ederek yaşlanma sürecini hızlandırmanın yanı sıra damar tıkanıklığı, diyabet, Alzheimer ve kanser gibi birçok rahatsızlığın oluşmasında ve ilerlemesinde önemli bir etkidir (Akhmadeeva, 2018; Çağlar, 2019). Bu bağlamda antioksidan özellikteki BAP'lar, oksidatif stresin geciktirilmesi ya da önlenmesinde oldukça önemlidir (Kim ve ark, 2013; Sarmadi ve Ismail, 2010). Peptitlerin antioksidatif etkisi, peptidin amino asit kompozisyonu, hidrofobik özelliği ve elektron transferi ile yakından ilişkilidir (Lemes ve ark, 2016). Peptitlerin ve amino

asitlerin, oksidasyon öncülü (prooksidan) metal iyonlarını bağlayabilme yeteneklerinin peptitlere antioksidan özellik kazandırdığı bilinmektedir. Örneğin, bazı aromatik amino asitlerin (tirozin, fenilalanin, triptofan gibi) ve kükürt içeren amino asidin (sistein gibi) antioksidan aktivitesi, protonlarını serbest radikallere verme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Rajapakse ve ark, 2005; Sarmadi ve Ismail, 2010).

Bazık amino asitler (lisin, arjinin gibi) ile asidik amino asitlerin (aspartik asit, glutamik asit gibi) antioksidan etkinliği ise metal iyonları ile şelat oluşturma yeteneklerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Liu ve ark, 2016). Peptit yapısındaki amino asit kompozisyonunun yanı sıra bu amino asitlerin peptit dizisindeki konumları da antioksidatif etki için önemlidir (Çağlar, 2019; Daşkaya-Dikmen, 2018).

Literatürde antioksidan peptitlerin balıklardan (örn; somon (Wu ve ark, 2017), sardalya (Bougatef ve ark, 2010), tilapia (Zhang ve ark, 2012), gökkuşağı alabalığı (Nguyen ve ark, 2017), saçkuyruk (Yang ve ark, 2019), ot sazanı (Yi ve ark, 2017)); diğer deniz ürünlerinden (örn; deniz tulumlusu (Kim ve ark, 2018), mavi midye (Park ve ark, 2016), deniz hıyarı (Jin ve ark, 2019)); tahıl ürünlerinden (örn; buğday (Elmalimadi ve ark, 2017), pirinç (Wattanasiritham ve ark, 2016), arpa (Xia ve ark, 2012), mısır (Jin ve ark, 2016)); baklagillerden (örn; beyaz fasulye (de Castro ve ark, 2017), soya fasulyesi (Zhang ve ark, 2019a), güvercin bezelyesi (Olagunju ve ark, 2018), pajuro (Intiquilla ve ark, 2019)); yumurtadan (Nimalaratne ve ark, 2015); süt ve süt ürünlerinden (örn; peynir altı suyu proteini (O'Keeffe ve ark, 2017), manda sütü (Abdel-Hamid ve ark, 2017), deve sütü (Kumar ve ark, 2016)); bitkilerden (örn; tatlı patates (Zhang ve Mu, 2017), Çin kestanesi (Feng ve ark, 2018)) ve deniz yosunundan (Harnedy ve ark, 2017) üretimi bildirilmiştir.

2.2.2. Antihipertansif etki

Dünya nüfusunun önemli bir kısmı (yaklaşık 1/8) için risk faktörü oluşturan yüksek tansiyon (hipertansiyon), kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda en önemli faktördür (Elkhtab ve ark, 2017). Damar tıkanıklığı, kalp krizi, kalp yetmezliği, böbrek sorunları, görme kaybı ve felç gibi ciddi sorunlara neden olmaktadır (Panayotova ve ark, 2018). Bu bağlamda BAP'lar yüksek tansiyonun dengelenmesinde önemli bir role sahiptir. Peptitlerin antihipertansif mekanizması, anjiyotensin dönüştürücü enzimin (ADE) inhibisyonuna dayanmaktadır. Memelilerde kan basıncı, sıvı ve tuz dengesi üzerinde önemli fizyolojik etkisi olan ADE, bir dipeptidil karboksipeptidaz olup

anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye dönüştürür ve vazokonstriktör etkiye sahiptir (Gobbetti ve ark, 2004). Bu nedenle ADE inhibitörü peptidler yüksek tansiyonu düşürmede potansiyel ajanlardır. ADE inhibitör peptitlerin genellikle 5 kDa'dan daha az moleküler ağırlığa sahip kısa zincirli peptitlerdir (2-20 amino asit). En etkili ADE inhibitör peptitlerinin C-terminal pozisyonlarında hidrofobik (aromatik veya dallı yan zincirler) amino asitler içerdiği veya C-terminal kalıntısı olarak Lys (-amino grubu) ve Arg (guanidin grubu) tarafından pozitif yüklendiği bildirilmektedir (Hernández-Ledesma ve ark, 2011; Schmelzer ve ark, 2007).

Fermente süt ürünleri, en bilinen ADE inhibitör peptitlerini içerdiklerinden hipotansif peptitlerin ana grubudur. Kazein ve peynir altı suyu proteinleri, özellikle α -laktalbümin ve β -laktoglobülin, ADE inhibitörlerinin zengin kaynaklarıdır. Gıdaların fermentasyon ve olgunlaşma süreci sırasında, peptit dizilerindeki inaktif ve şifrelenmiş peptitler salınması sebebiyle süt ürünleri doğal bir şekilde BAP içerebilmektedir. Bununla birlikte, en fazla BAP salınımı süt proteinlerinin mide ve pankreas enzimleri tarafından sindirimi esnasında gerçekleşmektedir (Erdmann ve ark, 2008; Simonetti ve ark, 2017).

2.2.3. Antimikrobiyel etki

Antimikrobiyel direnç dünyada son yıllardaki önemli sorunlardan biridir ve bu nedenle etkili ve toksik olmayan antimikrobiyel bileşiklerin geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Antimikrobiyel peptitler (AMP'ler), genellikle 5-40 amino asitten oluşan, hidrofilik ve hidrofobik özellikler taşıyan pozitif yüklü yapılardır. AMP'ler, organizmaların savunma mekanizmaları tarafından üretilen doğal bileşiklerdir. Amfipatik özellikleri sayesinde su içeren ortamlarda çözünebilmekte ve lipitçe zengin membranlara girebilmektedirler. Net yükün pozitif olması, peptit yapısındaki bazik amino asit sayısının asidik amino asit sayısından fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Hancock ve Sahl, 2006; Nordström ve ark, 2018). AMP'ler sadece membrana sahip olan hedeflere etki etmektedir (Kamaoğlu, 2014; Ruh, 2012).

Tespit edilen ilk AMP, toprak orijinli bir bakteri suşu olan *Bacillus brevis*'e ait olup Dubos tarafından 1939 yılında keşfedilmiştir. Bakteriye ait ekstrakt fareler üzerinde denenmiş ve zatürreyi tedavi etmede başarılı bulunmuştur. Günümüzde hayvanlar, bitkiler, böcekler ve bakterilere ait tespit edilen ve sentezlenmiş yaklaşık 5000 farklı AMP olduğu bildirilmektedir. Gram pozitif bakteriler içerisinde bilhassa laktik asit üretenlerin AMP sentezlediği bilinmektedir. Bu AMP'lerin ortak özelliği 30-60 amino

asitten oluşması ve kuvvetli katyonik özellikte (pI 8,9-10,7), sıcaklığa dayanıklı (100 °C, 15 dk.) ve pozitif yüklü olmasıdır (Reddy ve ark, 2004).

Antimikrobiyel etki mekanizması, peptidin mikroorganizma membranı ile etkileşime girmesi sonucu membran yapı ve geçirgenliğinin değişmesi; ya da mikroorganizma için hayati değeri olan hücresel bileşiklerin (nükleik asit, protein, enzim gibi) sentezinin durdurulması sonucu, hücrenin dengesinin bozularak ölmesi temeline dayanmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, ökaryotik parazitler, mantarlar, zarflı virüsler ve hatta kanser hücreleri AMP'lerin hedefi olabilmektedir. Ayrıca, insan patojeni olan önemli mikroorganizmaların hiçbirinin AMP'lere karşı doğal dirençli olmadığı belirlenmiştir (Kılıç, 2010; Reddy ve ark, 2004; Yılmaz, 2010).

Sütün birincil yapısı, son yıllarda tanımlanan laktoferrisin gibi bir dizi protein ve AMP içermektedir. Çalışmalar, sütteki antibakteriyel peptitlerin, tek tek toplamalarından daha fazla biyoaktivite sergilediğini göstermiştir; bu da peptitlerin sinerjik etkisine işaret etmektedir (Gobbetti ve ark, 2004). Ayrıca, *Bacillus* cinsi bakteriler AMP salgılaması sebebiyle kimyasal koruyuculara alternatif olabilir. Nisin, *Lactococcus lactis*'in salgısı olup, gıda muhafazası için yaygın olarak kullanılan polisiklik antibakteriyel peptitlerden biridir (Rai ve ark, 2016). İstiridye (*Crassostrea gigas*), sarı yayın balığı (*Pelteobagrus fulvidraco*), Atlantik Morinası (*Gadus morhua*), sünger (*Trichoderma* sp.) ve sardalya (*Sardinella aurita*) gibi deniz organizmalarının çeşitli AMP'lerin üretimini güvenli ve doğal bir şekilde sağladığı bildirilmiştir (Jemil ve ark, 2017). Ayrıca, balkabağı (*Cucurbita pepo*) yağ üretimi atık keki (Nor Mohamadi ve ark, 2017) antibakteriyel peptitlerin üretimi için iyi protein öncüleri olarak değerlendirilmiştir.

2.2.4. Mineral bağlayıcı etki

Önemli sağlık sorunlarından biri olan mineral eksikliği, mineral bağlayıcı peptitler ile önlenabilmektedir. Mineral bağlayıcı olarak fosfopeptitler, çözünür organofosfat tuzları oluşturur ve başta kalsiyum olmak üzere farklı mineraller için taşıyıcı görevi görür (Meisel ve Olieman, 1998). Kazeinofosfopeptit (KFP), kalsiyum bağlayıcı fosfopeptit olup fosforil köküne sahiptir. Peptitteki negatif yüklü fosfoseril yan zinciri, minerallerin anyonik bağlanma noktası konumundadır. Kazeinin farklı fosfopeptit fraksiyonlarının, bağlanma noktasındaki amino asitlere bağlı olarak kalsiyum bağlama aktivitesi değişiklik göstermektedir. KFP, minerallerle çözünür formda tuz

kompleksleri oluşturmakta ve bağırsak lümeninde ileri proteolize direnç göstermektedir. Böylece peptit, ince bağırsağın uç kısmında minerallerin çökmesini sınırlandırarak emilimin artmasını sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada raşidik bebekler için bebek mamasına KFP ilavesinin kemiklerdeki kalsiyum emilimini arttırdığı bildirilmiştir (Meisel, 2004; Yüksel, 2018).

2.2.5. Bağışıklık sistemini düzenleyici etki

Sağlıksız yaşam koşulları ve stres vücutta olumsuz etkiler yaratsa da, bağışıklık sistemi hastalıkların kontrolü ve önlenmesindeki en önemli mekanizmadır (Santiago-López ve ark, 2016). Bilimsel çalışmalar beslenme alışkanlıklarının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini kanıtlanmıştır (Agyei ve Danquah, 2012). Bu sebeple, yan etkisi bulunan kimyasal ilaçlar için alternatif ürün geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır (Aluko, 2008). Bu bağlamda, bağışıklık düzenleyici (immunomodülatör) peptitler sağlığın korunması ve hastalık riskinin azaltılmasında potansiyel öneme sahiptir (Mansour ve ark, 2014). Peptitlerin immünomodülatör aktivitesi, konaktaki istilacı mikroplarla etkileşime girerek veya bağışıklık sistemi elemanlarını baskılayarak veya uyarak ortaya çıkmaktadır (Dutta, 2002). Yapılan araştırmalar gıda kaynaklı ve bağışıklık düzenleyici etkisi olduğu tespit edilmiş pek çok protein hidrolizati ve peptidin bulunduğunu ortaya koymuştur (Hachimura ve ark, 2018).

Süt proteinlerinin BAP'larca zengin olduğu bilinmektedir. Sütteki laktoferrin ve laktoperoksidaz, bulundukları ortamda doğal immunomodülatör ajan görevi görmektedir. Buna karşın ortama farklı maddelerin ilavesi etkinliklerini azaltmaktadır. Bu durum temel süt proteinlerinin immünomodülatör aktivitesinin kendi içerisinde dengede olduğunu; ancak bazı bileşenlerin izolasyonu veya nötralizasyonu ile düzenleyici aktivitenin kaybolduğunu göstermektedir (Möller ve ark, 2008). Bir araştırmada, peynir altı suyu proteinlerinin özel ve özel olmayan bağışıklık yanıtlarını *in vivo* (farelerde) ve *in vitro* azalttığı rapor edilmiştir. Diğer bir araştırmada, pankreatin ile hidrolize edilmiş *Chlorella vulgaris* hidrolizati beslenme yetersizliği olan farelere oral yoldan verildiğinde farelerin hücresel bağışıklık fonksiyonlarını arttırdığı bildirilmiştir (Agyei ve Danquah, 2012). Süt, peynir altı suyu, mantar, yumurta, balık, istiridye, pirinç, buğday, soya fasulyesi, mikroalg ve sarı bezelye bağışıklık düzenleyici peptitlerin elde edildiği kaynaklardan bazılarıdır (Agyei ve Danquah, 2012; Chalamaiah ve ark, 2018).

2.2.6. Opioid etki

Sinir sistemi üzerinde etkili olan opioid peptitler, beyinde opium (afyon/morfin) benzeri etki göstererek stres, acı gibi duygusal tepkilerde, motivasyon ve uyku üzerinde, besin alımı kontrolünde ve insan davranışlarının düzenlenmesinde rol almaktadır (Brownstein, 1993). Opioid peptitler vücut tarafından üretilbildiği gibi (endorfin gibi), besinlerin sindirimi ile de oluşabilmektedir (kazomorfin, ekzorfin gibi) (Meisel ve Fitzgerald, 2000; Sienkiewicz-Szlapka ve ark, 2009).

Kazomorfinler (α ve β), α -laktorfin, β -laktorfin, laktoferoksinler ve kazokinler süt proteinlerinden salındığı bilinen opioid peptitlerdir (Meisel ve Fitzgerald, 2000; Meisel ve Schlimme, 1990; Yoshikawa ve ark, 1986). Süt ve süt ürünleri tüketimi sonrası oluşan opioid peptitler beyin ve çeşitli organlara ulaşarak sakinleştirici ve uykuya dalmayı kolaylaştırıcı etki göstermektedir (Dela Pena ve ark, 2015). α -laktorfin peptiti içerik olarak triptofan amino asidince zengindir. Bu durum peptidin beyinde serotonin üretimini de arttırabileceğine işaret etmektedir (Segura ve Ventura, 1988). Opioid peptitlerin aktivitelerini göstermesi için hedef hücredeki özel reseptörlere bağlanması gerektiği bildirilmektedir (Froehlich, 1997). Bir çalışmada, opioid etkinliğinin belirlenmesi amacıyla buğday proteini (glüten) proteolitik enzimler ile hidroliz ve LAB kullanılarak fermente edilmiştir. Araştırma sonuçları iki üretim yöntemi ile de morfin ve kodein benzeri opioid peptitler üretildiğini ve glutenin alternatif bir kaynak olabileceğini göstermiştir (Garg, 2019).

2.2.7. Antitrombotik etki

Kandaki g-zincir fibrinojeni ile sütteki κ -kazein arasında benzer dizilerin (homolog sekansların) bulunduğu kanıtlanarak süt ve kanın pıhtılaşma mekanizmalarının benzer olduğu tespit edilmiştir (Jollès ve ark, 1978; Rutherford ve Gill, 2000). κ -kazeinin kimozi ile etkileşimi sonucu görülen pıhtılaşma mekanizmasının, fibrinojenin trombin ile etkileşimi sonucu görülen pıhtılaşma mekanizması ile aynı olduğu bilinmektedir (Bode, 2006). Bazı peptitlerin trombin inhibe edici aktivite gösterdiği keşfedilmiştir. Kazein açısından zengin gıdaların anti-trombin peptitlerinin türetilmesi için mükemmel öncüller olduğu bildirilmiştir (Tu ve ark, 2017). Kazoplatelin, tripsin kullanılarak κ -kazeinin hidrolizi sonucu oluşan bir antiplatelet (pıhtılaşma karşıtı) peptittir (Rojas-Ronquillo ve ark, 2012). Sindirim sırasında midede serbest bırakılarak aktive olmakta, daha sonra plazmada emilmektedir (Chabance ve ark, 1998). Kazoplatelin, fibrinojenin trombositlere bağlanmasını önleyerek *in vivo* antitrombotik

aktivite göstermektedir (Tu ve ark, 2017). Chabance ve ark. (1995), bebeklerin insan sütü veya inek sütü ile beslenmesinden sonra plazmasında antitrombotik peptitler tespit etmişlerdir (Chabance ve ark, 1995). Günümüzde antitrombotik peptitlerin potansiyel fizyolojik etkileri hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır ve konu üzerindeki araştırmalar devam etmektedir (Sharma ve ark, 2011).

2.3. Biyoaktif Peptitlerin Üretim Yöntemleri

2.3.1. Enzimatik hidroliz

BAP üretiminde proteinlerin enzimatik hidrolizi en yaygın kullanılan yöntemdir. Pepsin ve tripsin gibi gastrointestinal enzimler ile bakteriyel ve fungal kaynaklı proteolitik enzimler bilinen pek çok BAP'ın üretiminde kullanılmaktadır. Alkalaz, kimotripsin, pankreatin, tripsin ve termolisin gibi proteolitik enzimlerin tek başına veya kombine şekilde kullanılmasıyla çeşitli BAP'ların elde edildiği bildirilmiştir. Tripsin enzimi kullanılarak üretilen peptitlerin içerisinde en yaygın bulunan peptitler ADE inhibitörü ve kalsiyum bağlayıcı özellikteki peptitlerdir (Yerlikaya ve ark, 2011). Yapılan bir *in vitro* çalışmada kazeininin tripsin + pepsin kombinasyonu ile 4 saat hidrolizi sonucu antioksidan özelliğe sahip peptit üretilmiştir (Irshad ve ark, 2015).

2.3.2. Mikrobiyel fermantasyon

Mikrobiyel fermantasyon ile BAP üretimi, genellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde starter veya starter olmayan proteolitik bakterilerin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. rhamnosus* GG gibi laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri, bakteri hücre duvarında bulunan proteinazlardan ve endopeptidaz, aminopeptidaz, dipeptidaz ve tripeptidazlar gibi çok sayıda hücre içi peptidazdan meydana gelmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda süt proteinlerinin mikrobiyel proteolize uğraması sonucu antioksidan, antimikrobiyel, antihipertansif ve bağışıklık düzenleyici BAP'ların üretildiği bildirilmiştir (Gürkan, 2019).

2.3.3. Kimyasal sentez

Kimyasal sentez, organik moleküllerin arzu edilen fizikokimyasal özelliklere sahip olması için başvurulmuş etkin bir yöntemdir. Sıvı ve katı fazlarda uygulamaya koyulan deneysel ve *in silico* (bilgisayar simülasyonuna dayalı) yaklaşımlar, biyolojik çalışmalarda kullanılabilecek farklı özelliklere sahip moleküllerin tasarımı ve

yapılandırılmasına imkân sağlamaktadır (Kishore, 2004; Rajesh ve Iqbal, 2006; Saladino, 2012). Oksidasyona bağılı gerçekleşen bazı patolojik durumların tedavisinde kullanılmak üzere terapötik (tedavi edici) etkinliği bulunan peptitlerin kimyasal sentez ile üretimine artan bir ilgi bulunmaktadır (Van Lancker ve ark, 2011). Kimyasal sentez ile üretilen bir peptidin (Lys-Arg-Glu-Ser) farelere ağız yolu ile verilmesinin ardından farelerde LDL peroksidasyonunun azaldığı, iltihaplanmanın hafiflediği ve damar sertliğinin azaldığı bildirilmiştir (Navab ve ark, 2004). Bununla birlikte, peptit dizisinin değiştirilmesi (Lys-Glu-Arg-Ser) biyolojik aktivitenin kaybolmasına neden olmuş ve bu durum, sadece belirli dizilimdeki yapıların aktiviteye sahip olduğu olgusu ile ilişkilendirilmiştir (Navab ve ark, 2009).

2.4. Enzimatik Hidroliz ile BAP Üretimi

Enzimatik hidroliz, organizmalarda doğal bir süreçtir ve organizmanın metabolik aktiviteleri sırasında ve/veya sonucunda gerçekleşir. Sindirim sırasında, pepsin ve tripsin gibi gastrointestinal enzimler peptit zincirlerini küçük parçalara ayırmakta ve böylece BAP'lar oluşmaktadır (Fruton, 1976; Matsui ve ark, 2002; Tomita ve ark, 1991). BAP'ların serbest bırakılması çoğunlukla midede süt proteinlerinin sindirimi sırasında gerçekleşir. Salınan peptitlerin kan dolaşımına karışmak üzere bağırsaktan emildiği; ya da gastrointestinal sistem içerisinde bölgesel etkiler oluşturduğu bilinmektedir (Jin ve ark, 2016; Simonetti ve ark, 2017). Fermente gıdalarda mikrobiyel aktivitenin sonucunda açığa çıkan BAP'ların saflaştırılmasından önce gıdanın daha fazla hidrolizine gerek olmayabilir (Kim ve Wijesekara, 2010).

Mikroorganizmalardan, bitkilerden ve memeli dokularından elde edilen proteolitik enzimler, peptitlerin/proteinlerin *in vitro* hidroliz reaksiyonlarını katalize etmede kullanılabilir (Olempska-Beer ve ark, 2006). Bu enzimler ticari olarak üretilir ve serbest veya immobilize formda kullanılabilir. Enzimatik hidroliz, hedeflenen işlevsel özelliklere sahip peptitlerin üretimi için en etkili ve güvenilir yol olarak bildirilmektedir. Bu yöntem genellikle çok kısa peptitlerin salınması için tercih edilmektedir (Dávalos ve ark, 2004). Ayrıca, son yıllarda rekombinant mikroorganizmalarla BAP üretimi ilgi görmekte, genetiği değiştirilmiş suşlar, istenmeyen mikrobiyel metabolitler olmaksızın istenen enzimlerin daha verimli bir şekilde üretimine olanak tanımaktadır. Ancak bu türler genellikle geleneksel yöntemlerle laboratuvar koşullarında yetiştirilmeye uygun değildir ve bu da

uygulamalarını sınırlamaktadır (Olempska-Beer ve ark, 2006). Protein hidrolizatı ve peptitlerin biyolojik ve fonksiyonel etkinliği protein kaynağına, substrata uygulanan ön işleme, kullanılan proteolitik enzime ve hidroliz koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Daliri ve ark, 2017; Zarei ve ark, 2012).

2.4.1. Proteazlar

Her enzim karakter olarak oldukça spesifik olup belirli bir substrat veya substratlar üzerine etki ederek belirli bir ürün veya ürünleri meydana getirmektedir (Palmer ve Bonner, 2007). Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC) tarafından enzimler, katalizlenen tepkime türüne göre yedi sınıfa ayrılmıştır: oksidoredüktazlar (EC 1), transferazlar (EC 2), hidrolazlar (EC 3), liyazlar (EC 4), izomerazlar (EC 5), ligazlar (EC 6) ve sınıflandırmaya 2018 yılında dahil edilmiş olan translokazlar (EC 7) (McDonald ve Tipton, 2023). IEC'e göre sınıflandırılmış enzimler ve katalizlenen tepkime türleri şematize edilerek Tablo 2.1'de gösterilmiştir (McDonald ve Tipton, 2014).

Proteazlar hidrolitik enzimler olup esterazlar, lipazlar, amilazlar, asilazlar, fosfatazlar, selülazlar ve haloalkan dehalojenazlar ile birlikte hidrolazlar (EC 3) sınıfına dâhildir. Bu sınıfa ait enzimler karbon-oksijen, karbon-azot ve karbon-sülfür kimyasal bağlarını bağı su ekleyerek kırmaktadır (Zhu ve ark, 2019).

Tablo 2.1. Katalizlenen tepkime türüne göre enzimlerin sınıflandırılması.

Sınıf	Ad	Katalizlenen tepkime
1.	Oksidoredüktazlar	$AH_2 + B = A + BH_2$ veya $AH_2 + B^+ = A + BH + H^+$
2.	Transferazlar	$AX + B = A + BX$
3.	Hidrolazlar	$A-B + H_2O = AH + BOH$ $A = B + X-Y = A-B$
4.	Liyazlar	$\begin{array}{c} \quad \\ X \quad Y \end{array}$
5.	İzomerazlar	$A = B$
6.	Ligazlar	$A + B + NTP = A-B + NDP + P$ veya $A + B + NTP = A-B + NMP + PP$
7.	Translokazlar	$AX + B_{[1. \text{ taraf}]} = A + X + B_{[2. \text{ taraf}]}$

*NTP nükleozit trifosfatı ve || şekli membranı temsil etmektedir.

Proteazlar prokaryot, fungus, bitki ve hayvanlar olmak üzere neredeyse yeryüzündeki tüm yaşam formları için gerekli biyomoleküllerdir. Endüstriyel proteazlar çoğunlukla deterjan, gıda, deri, tekstil ve ilaç sanayi, tanı koyma, evsel ve endüstriyel atık yönetimi, gümüş geri kazanımı ve biyoremediasyon süreçlerinde kullanılırlar. Proteazların en sık kullanıldığı uygulamaların başında çamaşır deterjanı üretimi

(protein bazlı lekelerin giderimi) ve deri endüstrisi (kıl giderimi) gelmektedir (Hamza, 2017).

Mikrobiyel proteazlar biyoteknolojik uygulamalar için istenilen özelliklerin neredeyse tümünü barındırmakta ve bu sebeple bitkisel ve hayvansal proteazlara kıyasla endüstride çok daha fazla kullanılmaktadır (Balakrishnan ve ark, 2012). Endüstriyel enzimlerin en büyük gruplarından birini temsil eden mikrobiyel proteazlar, toplam global endüstriyel enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Gupta ve ark, 2002; Madhavi ve ark, 2011). Mikroorganizmalar, hücre içi ve/veya hücre dışı olmak üzere geniş bir yelpazede proteaz çeşidi üretirler. Bu sebeple proteazlar çeşitli biyoteknolojik alanlarda çok yönlü enzim uygulamalarına öncülük etmektedirler. Proteazlar hücre içinde üretildiklerinde, salınımları sırasında hücre duvarına kovalent olarak bağlanırlar. Hücre içi proteazlar sporülasyon ve farklılaşma, protein dönüşümü, enzimlerin ve hormonların olgunlaşması ve hücre protein havuzunun bakım ve onarımı gibi çeşitli hücre ve metabolik süreçler için önemliken; hücre dışı proteazlar hücre dışı ortamlarda proteinlerin hidrolizi için önemlidir ve hücrenin hidrolitik ürünleri emmesini ve kullanmasına olanak verir. Hücre dışı proteazlar aynı zamanda çeşitli endüstriyel süreçlerde proteinlerin bozunmasına yardımcı olarak ticari amaçla kullanılmaktadırlar (Balachandran ve ark, 2021; Kumar ve Takagi, 1999; Takahashi ve ark, 2011).

Proteaz kaynağı olarak bitkilerin kullanımında tarıma uygun arazinin temini ve bitki yetiştirme için iklim koşullarının uygun ve sürdürülebilir olması gibi çeşitli faktörler önem taşımaktadır. Ayrıca, bitkilerden proteaz üretimi zaman alıcı bir işlemdir. Papain, bromelain, keratinaz ve fisin, bitkisel kaynaklı proteazlara örnektir (Smidsrød ve Skja, 1990). Hayvansal kökenli en önemli proteazlar ise tripsin, kimotripsin, pepsin ve renindir. Saf olarak ve yüksek miktarda elde edilmesi istenen bu enzimlerin üretimi mevcut hayvan sayısına bağlıdır ve bu durum da siyasi ve tarımsal politikalar tarafından yönetilmektedir (Jenne ve Tschopp, 1988). Bu bağlamda bitki ve hayvan proteazlarının dünya geneli mevcut talebi karşılayamaması, mikrobiyel proteazlara olan ilginin artmasına yol açmıştır. Mikroorganizmalar, geniş biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyona duyarlılıkları nedeniyle çok iyi bir enzim kaynağıdır. Bu nedenle, mikrobiyel kaynaklardan elde edilen proteazlar, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir (Hamza, 2017). Ayrıca, mikrobiyel enzimler biyoteknolojik uygulamalar için istenen hemen

hemen tüm özelliklere sahiptirler. Mikroorganizmalar arasında bakteri ve funguslar en baskın olanlardır. Bakteriler arasında *Bacillus* cinsine ait türlerden alcalase ve neutrase gibi önemli endüstriyel proteazların üretiminde yararlanılmaktadır. Alcalase® 2,4 L FG, *Bacillus licheniformis* tarafından elde edilen ve amino ester bağlarını parçalayan serin endoproteazdır. Optimum çalışma sıcaklığı 30-65 °C ve pH'ı 7,0-9,0 olarak belirlenmiştir. Proteaz aktivitesi 2,4 Anson Unit (AU)/g olarak bildirilmiştir (Hrckova ve ark, 2002). Neutrase® 0,8 L, *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen ve peptit zincirindeki iç bağlar üzerine etki eden (endoproteaz) bir metalloproteazdır. Optimum çalışma sıcaklığı 40-50 °C ve pH'ı 7 olup proteaz aktivitesi 0,8 AU/g olarak bildirilmiştir (Yu ve Mikiashvili, 2020). Bununla birlikte, rekombinant proteazlar da endüstriyel uygulamalarda sıklıkla yer bulmaktadır. Ticari rekombinant proteazlardan biri olan rTrypsin®, mikrobiyel fermentasyon yoluyla elde edilen ve granül halinde serin endoproteazdır. Karboksil grubunda arjinin veya lisin amino asitlerinden birini içeren bir peptidin amid ve ester bağlarını parçalayarak pozitif yüklü kalıntılar (Arg/Lys) açığa çıkarmaktadır. Optimum pH'ı 7,8-8,0 ve proteaz aktivitesi en az 800 USP/mg olarak bildirilmiştir (Di Cera, 2009).

Fungal proteazlar bakteriyel proteazlarla kıyaslandığında daha geniş bir pH aralığında (pH 4 ile 11) aktiftir ve daha geniş bir substrat özgüllüğü gösterir. Örneğin, *Aspergillus oryzae* asit, nötr ve alkali olmak üzere üç proteaz üretmektedir. Ancak, fungal proteazların tepkime hızı daha düşüktür ve ısı toleransları bakteriyel proteazlarınkı kadar iyi değildir. Fungal proteazların avantajı, katı hal fermentasyonu ile rahatlıkla üretilbilir olmalarıdır. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* en önemli fungal proteaz kaynaklarıdır (Sandhya ve ark, 2005). Flavourzyme® 1000 L, ticari olarak yaygın kullanılan fungal proteazlardan biri olup, *Aspergillus oryzae*'nin fermentasyonu ile elde edilen ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip bir aminopeptidazdır. Endoproteaz ve ekzoproteaz aktivite gösteren Flavourzyme'ın proteolitik aktivitesi baskın olarak ekzoproteaz kaynaklıdır. Peptit üzerindeki etki mekanizması, N ucundaki peptit bağını parçalayarak kısa zincirli bir peptit ya da amino asit açığa çıkarması şeklindedir. Proteaz aktivitesi 1000 lösin aminopeptidaz ünite/g (LAPU/g)'dır. Optimum çalışma sıcaklığı 30-65 °C ve 4,0-8,0 pH olarak bildirilmektedir (Bruno ve ark, 2019). Bununla birlikte, viral kökenli proteazlar da ilaç tasarım ve geliştirme çalışmalarında yer alarak son yıllarda bilimsel araştırmaların odak konusu olmuştur (Ashwini ve Manjusha,

2023). Bakteriler arasında *Bacillus* cinsi bakteriler endüstriyel kullanımda ilgi çeken bir proteaz kaynağıdır (Kumar ve Takagi, 1999).

2.4.2. Proteazların sınıflandırılması

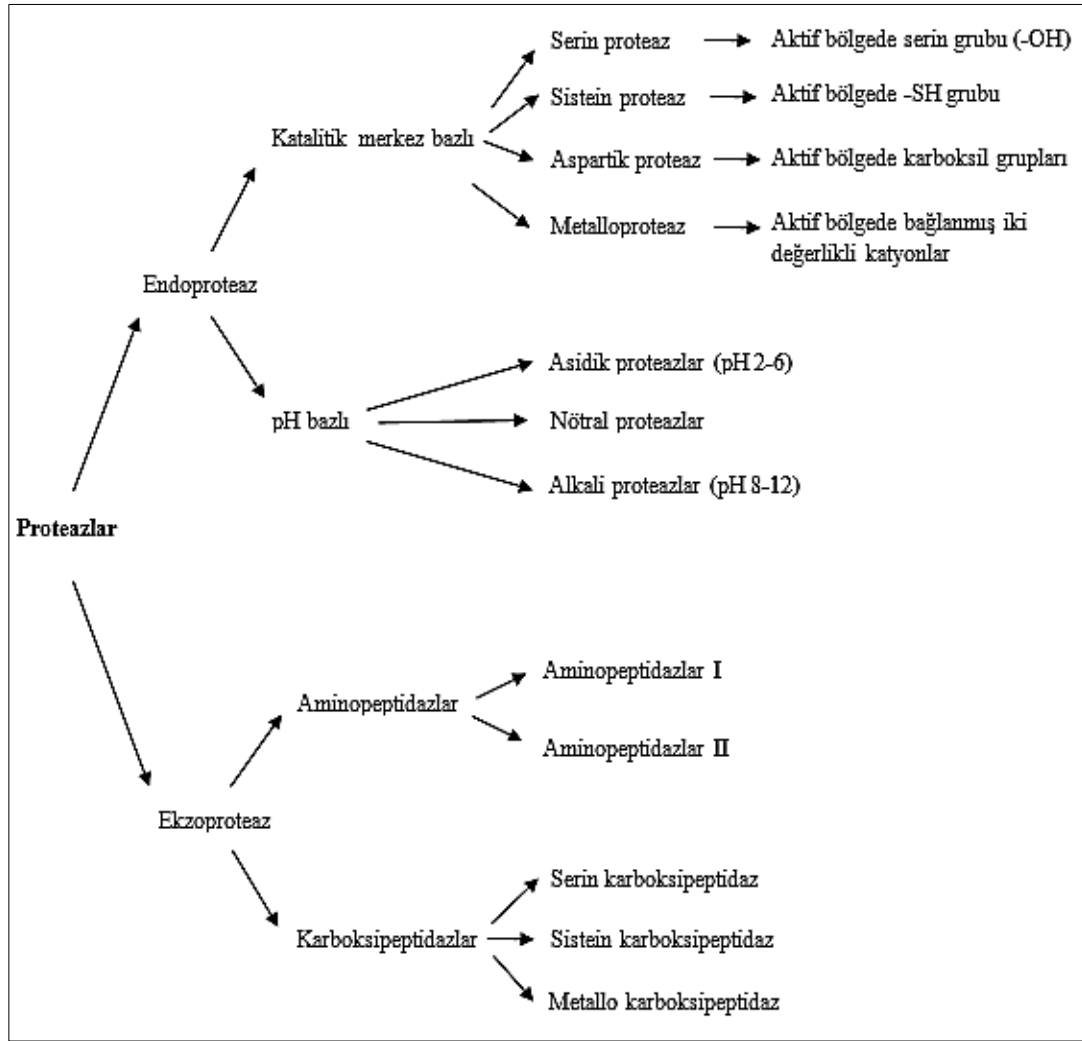
Canlı organizmaların evrimsel karmaşıklığının bir sonucu olarak enzimler geniş bir fonksiyon repertuarına sahip, çok çeşitli yapı ve özellikte bulunmaktadır. Enzimler bu karmaşık yapıları sebebiyle farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Tavano, 2013). Proteazların sınıflandırılması aktif bölgenin kimyasal yapısına, katalize ettikleri tepkimeye ve yapı ve kompozisyonuna göre gerçekleştirilebilir. Proteazlar genel olarak substrat üzerindeki katalitik bölgeye göre endoproteazlar ve ekzoproteazlar olarak gruplandırılmaktadırlar. Ekzoproteazlar polipeptit zincirinin sonuna etki ederken, endoproteazlar polipeptit zincirinin iç bölgesine etki etmektedir. Ekzoproteazlar ayrıca polipeptit substratının serbest N-terminaline ve serbest C-terminaline etki etmesine bağlı olarak sırasıyla amino peptidazlar ve karboksipeptidazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Benzer şekilde, endoproteazlar da yan zincirlerinin özgüllüklerine ve karakteristik aktif bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplarına göre sınıflandırılır. Proteazlar aktif bölgelerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- 1) Serin proteazlar:** Serin proteazlar, aktif bölgelerinde bir serin grubu (-OH) bulunan proteazlar,
- 2) Sistein proteazlar:** Aktiviteleri, aktif bölgelerinde güçlü bir -SH grubunun varlığına bağlı olan proteazlar,
- 3) Metalloproteazlar:** Aktiviteleri, az veya çok sıkı bağlı iki değerlikli katyonların varlığına bağlı olan proteazlar,
- 4) Aspartik proteazlar:** Aktif bölgelerinde bir veya birden çok karboksil grubu yan zincirini içeren proteazlardır. Genellikle asit proteaz olarak bilinirler (Rao ve ark, 1998; Nduka, 2007).

Endoproteazlar, belirli bir pH aralığındaki maksimum aktivitelerine göre ise aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- 1) Asidik proteazlar:** pH 2-6 aralığında aktif olan proteazlar,
- 2) Nötr proteazlar:** Nötr, zayıf alkali veya zayıf asidik pH'ta aktif olan proteazlar,
- 3) Alkali proteazlar:** Alkali pH aralığında (8-12) aktif olan proteazlardır (Rao ve ark, 1998).

Alkali proteazlar, genellikle deterjan katkı maddesi olarak kullanılan, fizyolojik ve ticari açıdan önemli bir enzim grubudur. Proteinlerin hidrolizinde katalitik rol oynarlar (Gupta ve Ramnani, 2006; Kumari ve ark, 2009). Piyasada farklı kaynaklardan elde edilen çeşitli alkali proteazlar bulunsada da çoğu mikrobiyel kökenli ürünlerdir. Alkali proteazlar nötrofilik ve alkalifilik mikroorganizmalar tarafından üretilir. Alkalifilik mikroorganizmalar doğada yaygın olarak dağılmıştır ve alkalinite kısıtlaması olmaksızın hemen hemen tüm ortamlarda bulunabilir (Pathak ve Deshmukh, 2012). Proteazların sınıflandırılması Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. Proteazların sınıflandırılması.

2.4.3. Proteinlerin hidrolizi

Proteinlerin hidrolizi, endüstriyel pek çok süreçte yer alan geniş kapsamlı bir proses basamağıdır. Bu basamak, deterjan ve deri endüstrisi başta olmak üzere, proteomik çalışmalarda numune formülasyonlarının geliştirilmesi ve özel hastalar için beslenme desteği sunan protein hidrolizatlarının tasarlanması süreçlerinde yer bulabilir. Bununla

birlikte, istenilen biyolojik özellikteki hidrolizatların eldesi için substrat olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklar, özellikle et, süt, su ürünleri ve tahıllar ile bu ürünlerin işleme atıkları ve yan ürünleri substrat olarak kullanılmakta, böylece zengin protein içeriğindeki bu ürünler çevre dostu yaklaşımlarla değerlendirilerek ekonomik kazanç sağlanmaktadır (Dávalos ve ark, 2004; Korhonen ve Pihlanto, 2003; Mora ve ark, 2014).

Proteinlerin hidrolizinde peptit bağları enzimatik veya kimyasal süreçlerle parçalanabilmektedir. Kimyasal süreçler asit veya baz uygulamalarını içeren, kontrol edilmesi zor süreçlerdir. Amino asit tayininde kullanılan geleneksel asit hidroliz yönteminde 6 M HCl triptofanı tahrip ederken, alkali hidroliz ile sistin, arjinin, treonin, serin, izolösin ve/veya lizin içeriği azalabilmekte ve lizinoalanin veya lantionin gibi olağandışı amino asit kalıntıları oluşabilmektedir. Buna karşın enzimatik hidroliz, ılımlı koşullar altında gerçekleştirilebilen ve kimyasal işlemlerin gerektirdiği aşırı ortamları bertaraf eden bir süreçtir. Enzimatik hidrolizde genellikle yan tepkimeler gerçekleşmez ve protein kaynağının besin değeri azalmaz. Ayrıca enzimler, substrat özgüllüğü sunduğu için daha iyi karakterize edilmiş protein hidrolizatlarının geliştirilmesine olanak verir (Castro ve ark, 2011; Maldonado ve ark, 1998; Provansal ve ark, 1975; Tsugita ve Scheffler, 1982). Bu sebeple proteazlar (diğer bir ifade ile peptidazlar, proteolitik enzimler veya peptit bağı hidrolazları), gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Proteolitik hidroliz ile iyi tanımlanmış peptit profiline ve yüksek besin değerine sahip protein hidrolizatları hazırlanmakta ve mevcut protein kaynaklarının lezzeti ve depolama stabilitesi iyileştirilmektedir. Özellikle, sığır etinin yumuşatılmasında (tenderizasyonda) alkali proteazlardan sıklıkla yararlanılmaktadır (Gupta ve ark, 2002).

Öte yandan, proteolitik hidroliz de belirli zorluklar sunmaktadır. Örneğin, tek bir proteaz ile tüm proteini hidroliz etmek imkânsızdır. Ek olarak, protein yapısında gerçekleşen nispeten ufak değişiklikler, enzimin işlevine önemli hasar verebilir ve bu durum inhibitör ve kofaktör ihtiyacını doğurabilir veya otoliz gerçekleşebilir (Delhaye ve Landry, 1992; McGeagh ve ark, 2011; Mildner ve ark, 1994). Bu sebeple peptit ve/veya amino asitlerin istenilen özellikte eldesi ve muhafazası için proteaz türünün ve proses koşullarının seçimi ve kontrollü hidroliz gerçekleştirilmesi kritik önem taşımaktadır (Tavano, 2013). Saflaştırılmış ve ham enzimler biyoaktif özellikteki peptitlerin üretiminde kullanılmakta; ancak üretim maliyetini azaltmak adına ham

protein karışımları daha çok tercih edilmektedir (Zarei ve ark, 2012). Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeli olduğu belirlenen proteaz üretici bakteriler ve mikrobiyel proteazların uygulama alanları derlenerek Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Endüstriyel uygulama potansiyeline sahip proteaz üretici bakteriler ve uygulama alanları.

Proteaz üretici bakteri türü ve suşu	Endüstri	Kaynak
<i>Alkalihalobacillus patagoniensis</i> PAT 05T	Tekstil (organik yün işleme)	Olivera ve ark, 2021
<i>Arsukibacterium ikkense</i>	Deterjan	Lylloff ve ark, 2016
<i>Bacillus halodurans</i> BCRC 910501	Deri işleme	Biškauskaitė ve ark, 2024
<i>Bacillus licheniformis</i> NWMCC0046	Deterjan	Zhou ve ark, 2023b
<i>Bacillus safensis</i> PRN1	Deterjan	Neog ve ark, 2024
<i>Bacillus subtilis</i> A4	Deterjan ve gümüş geri kazanımı	Keshapaga ve ark, 2023
<i>Bacillus mojavensis</i> A21	Deterjan	Haddar ve ark, 2009
<i>Bacillus mojavensis</i> SA	Deterjan, deri işleme	Hammami ve ark, 2018
<i>Bacillus nakamurai</i> PL4	Deterjan, tüy ve keçi kılı giderimi	Shaikh ve ark, 2023
<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL.HK ve <i>Bacillus cereus</i> BS.P	Deri işleme	Akhtar ve ark, 2024
<i>Bacillus pumilus</i> SCU11	Deterjan, deri işleme ve hayvan yemi	Wang ve ark, 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MCM B-327	Deri işleme	Zambare ve ark, 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S-04	Tüy giderimi	Ramalingum ve ark, 2024

2.4.4. Proteinlerin enzimatik hidrolizine etki eden faktörler

2.4.4.1. Proteazın etkisi

Proteazlar, BAP üretimi gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için dünya çapında ticari kullanımı en yaygın enzimlerdir (Contesini ve ark, 2018). *Bacillus* cinsine ait türler ve laktik asit bakterileri (LAB) proteazların birincil kaynaklarıdır (Prasad ve ark, 2017). Uygun mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin seçimi protein hidrolizasyonunu ve biyoaktivitesini doğrudan etkilemektedir. Örneğin, antihipertansif peptit sentezinde LAB seçimi, LAB'ların proteolitik aktivite eğilimindeki farklılık nedeniyle temel faktörlerden biridir (Rubak ve ark, 2019; Worsztynowicz ve ark, 2020). Bununla birlikte *Bacillus*, ticari kullanım için diğer mikroorganizmalar arasında en çok tercih edilen cinstir. Mora ve ark. (2014)

tarafından yürütülen bir araştırmada *Bacillus thermoproteolyticus* (termolisin), *Bacillus amyloliquefaciens* (nötraz) ve *Bacillus licheniformis* (alkali) suşlarından salgılanan endo ve ekzo enzimlerin et endüstrisi atıklarından antihipertansif ve antioksidan peptitlerin üretiminde kullanılabileceği ortaya konmuştur. BAP üretim sürecinde hem saf hem de ham enzim kullanılabilirken, ham enzim (veya ikili ve üçlü karışımı) maliyetin düşürülmesi adına tercih edilebilmektedir (Zarei ve ark, 2012). Kullanılan enzimin spesifik olması ve hafif düzeyde hidroliz koşullarının yeterli olması enzimatik hidrolizi daha avantajlı bir yöntem haline getirmektedir (Chen ve ark, 2011).

2.4.4.2. Hidroliz derecesinin etkisi

Peptitlerin biyoaktif özellikleri hidroliz derecesi ile yakından ilgilidir. Hidroliz işlemi protein kaynağı ve seçilen proteaz türünün yanı sıra pH, sıcaklık, enzim-substrat oranı ve hidroliz süresi gibi hidroliz koşullarından doğrudan etkilenmektedir. Çalışmalar BAP'ların antioksidan kapasitelerinin genellikle moleküler ağırlığı < 3 kDa peptitler için daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, daha kısa zincirlere sahip peptitler gastrointestinal sistemde daha iyi emilebilmekte ve daha uzun zincirlere sahip olanlara göre gastrik enzimlere karşı daha dirençli olduğu bildirilmektedir (Lassoued ve ark, 2015). Bu nedenle, iyi bir hidroliz derecesi elde etmek önemlidir. Hidroliz ortamının pH'ı, proteoliz işlemi sırasında salınan protonlardan etkilenmektedir. Optimum hidrolize ulaşmak için asit veya alkali çözeltiler kullanılarak pH'ın ayarlanması gerekmektedir. Bu sebeple proteinlerin bir tampon çözeltide hidroliz edilmesi önerilmektedir (Daliri ve ark, 2017). Ayrıca, peptitlerin biyolojik özelliklerini etkileyen hidroliz süresi ve hidroliz derecesi arasında bir korelasyon olduğu da bildirilmektedir. Bir çalışmada, tavuk kesim atığı proteinleri Actinidin özütü ile hidroliz edilmiş ve artan süre (ilk 4 saatten 8 saate) peptitlerin antioksidan aktivitesinde azalmaya yol açmıştır (%85'ten %32'ye). Bu nedenle, ilerlemiş hidroliz antioksidan peptitlerin aktif bölgelerinin bozulmasına neden olabilmekte ve bu da biyoaktiviteyi zayıflatmaktadır (Parhizkari ve ark, 2019). Bununla birlikte, Fajardo-Espinoza ve ark. (2020), pepsin ve pankreatin ile sıralı bir hidroliz sistemi uygulayarak, sığır kolostrumundan elde edilen peptitlerin ADE inhibitör aktivitesi ve hidroliz derecesi arasında yüksek bir pozitif korelasyon bildirmiştir. Ayrıca, en düşük moleküler ağırlığa sahip peptit fraksiyonlarının en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilediğini gözlemlemişlerdir. Düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin daha güçlü

biyoaktiviteye sahip olduğuna dair genel kanının aksine, Maqsoudlou ve ark. (2019) 1,42 kDa ağırlığındaki peptide kıyasla daha yüksek ağırlığa (< 13 kDa) sahip peptitlerin ADE inhibitör aktivitesini daha yüksek tespit etmiştir. Özetle, istenilen peptit aktivitesini elde etmek veya artırmak için uygun adımların izlenmesi önemlidir.

2.4.4.3. Substratın etkisi

Çeşitli gıda proteinlerinin BAP üretiminde enzimatik hidroliz için substrat olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Örneğin et, süt ve su ürünleri, zengin protein içerikleri nedeniyle BAP üretmek için çok iyi protein öncülü kaynaklardır. Ayrıca, gıda atıklarının BAP gibi değerli ürünlere geri dönüştürülmesi, çevre ve dünya ekonomisi üzerinde olumlu bir etki yaratmaktadır. Son zamanlarda, birçok gıdadan ve yan ürünlerinden enzimatik hidroliz kullanılarak BAP ve protein hidrolizatlarının üretilebileceğine dair çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. Bazı gıda işleme süreçlerinde elde edilen yan ürünler ve bu ürünlerin farklı proteazlar ile muamelesi sonucu elde edilen hidrolizatların belirlenen biyolojik aktiviteleri derlenerek Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Çeşitli gıda işleme yan ürünlerinin proteolitik enzimler ile hidrolizi ve hidrolizatların biyoaktivite özellikleri.

Proteaz	Substrat	Hidrolizatın biyolojik aktivitesi	Kaynak
<i>Bacillus mojavensis</i> kaynaklı A21 alkali proteazı	Mavi yüzgeçli ton balığı (<i>Thunnus thynnus</i>) proteini	Antioksidan	Bougatef ve ark, 2012
<i>Bacillus cereus</i> kaynaklı SU12 proteazı	İstiridye (<i>Saccostrea cucullata</i>) doku proteini	Antioksidan ve antikanser	Umayaparvathi ve ark, 2014
<i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı Alcalase ve <i>Aspergillus oryzae</i> kaynaklı Flavourzyme	Gökkuşağı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) deri proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan ve antikanser (Flavourzyme hidrolizatının antioksidan aktivitesi daha yüksek)	Yaghoubzadeh ve ark, 2020
Alcalase, α -chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin, trypsin	Ton balığı yan ürünü (omurga) proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan	Je ve ark, 2007
Papaya kaynaklı papain, <i>Bacillus licheniformis</i> kaynaklı Alcalase	Patin balığı (<i>Pangasius sutchi</i>) sarkoplazmik proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan (Alcalase hidrolizatının aktivitesi daha yüksek)	Najafian ve Babji, 2014
Papaya (<i>Carica papaya</i>) kaynaklı papain, Domuz mide mukozası kaynaklı pepsin, domuz pankreası kaynaklı trypsin	Manda sütü proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan (papain> pepsin> trypsin) ve antihipertansif (papain>trypsin>pepsin)	Abdel-Hamid ve ark, 2017
Trypsin, alcalase	Alg (<i>Porphyra columbina</i>) yan ürünü proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan, bağışıklık baskılayıcı ve antihipertansif	Cian ve ark, 2012
<i>Bacillus subtilis</i> A26 kaynaklı proteaz	Sardalya (<i>Sardinella aurita</i>) kas proteini	Antibakteriyel, antioksidan ve antihipertansif	Jemil ve ark, 2017
Pepsin, trypsin ve alcalase	Yağ üretimi artığı kabak (<i>Cucurbita pepo</i>) keki proteini	Tüm hidrolizatlar antibakteriyel	Nor Mohamadi ve ark, 2017
Papain	Çia (<i>Salvia hispanica</i> L.) tohumu proteini	Antioksidan	Cotabarren ve ark, 2019
Alcalase, kolajenaz, proteinaz K, trypsin	Sazan balığı (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) deri proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan ve antihipertansif (Proteinaz K enzimi antihipertansif peptit üretiminde daha iyi)	Yi ve ark, 2017
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i> rokko kaynaklı termolisin	Peynir altı suyu proteini	Antioksidan	del Mar Contreras ve ark, 2011
Trypsin, pepsin, papain, α -chymotrypsin, alcalase	Deniz yosunu (<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>) proteini	Tüm hidrolizatlar antioksidan (α -chymotrypsin hidrolizatının aktivitesi en yüksek)	Zhang ve ark, 2019b
Alcalase ve neutrase (kombine)	Domuz kemik proteini	Kalsiyum iyonu bağlayıcı	Wu ve ark, 2019
Papain	Sarı yüzgeçli tuna (<i>Thunnus albacares</i>) et proteini	Antioksidan	Unnikrishnan ve ark, 2020
Proteaz P	Tavuk yumurtası beyazı	Antioksidan	Nimalaratne ve ark, 2015

2.5. Siyez Buğdayı

Tarım devriminden günümüze insanlığın başlıca gıda kaynağı olan buğday tek yıllık otsu bir bitkidir (Erkan ve Yılmaz, 2009). Bir buğday tanesi kabaca üç farklı kısımdan oluşmakta olup bu kısımlar kepek (%14,5), rüşeym (embriyo) (%2,5) ve endospermdir (%83) (Hemery ve ark, 2007). Kepek kısmı farklı katmanlardan oluşarak tahıl tanesini dış etkilere karşı koruma görevinde olup lif, antioksidan maddeler, B vitamini ve mineral yönünden zengindir. Rüşeym buğday tanesinin uç kısmında bulunan ve öz olarak da adlandırılan, buğdayın çimlenme, büyüme ve çoğalmasından sorumlu kısımdır. Rüşeymin besin içeriği zengin olup selüloz, antioksidan madde, E ve B vitamini (tiamin, riboflavin, niasin), demir, fosfor, çinko, doymamış yağ ve tokoferol miktarı yüksektir. Endosperm, buğday tanesinin iç bölgesinde yer alan ve tanenin yaklaşık %75'ini oluşturan beyaz renkli kısımdır. Depo proteinleri (gliadin ve glutenin) ile kompleks karbonhidratlarca zengindir. Bu kısım selüloz, vitamin ve mineral içermemektedir (Pomeranz, 1988). Buğday tanesinin tamamının öğütülmesi ile tam buğday unu üretilirken, endosperm kısmının ayrılıp öğütülmesi ile rafine veya beyaz un olarak adlandırılan, lif, mineral ve vitamin yönünden fakir fakat karbonhidrat ve protein içeriği zengin un elde edilmektedir (Ziegler ve Greer, 1971).

Siyez (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) buğdayı, bilinen en ilkel buğday türü olup tarihi yaklaşık 10 bin yıl öncesine dayanmaktadır. Durum buğdayı (makarnalık buğday), emmer (kavılca) buğdayı ve ekmeklik buğday ile aynı cinsin (*Triticum* cinsi) üyesi olan antik bir buğday çeşididir. Arkeolojik çalışmalar siyezin tarih öncesi (Epipaleolitik) döneme kadar dayandığını göstermektedir. Kökeninin Yakın Doğu ülkeleri, Türkiye, Bulgaristan, Yunanistan, Suriye, İsrail, Mısır, Etiyopya ve Levant olduğu tahmin edilmekte, ilk kez M. Ö. 9000'li yıllarda Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesindeki Karacadağ bölgesinde evcilleştirildiği düşünülmektedir (Cooper, 2015; Kimber ve Sears, 1987; Piperno ve ark, 2004).

Siyez buğdayı diploid, tek başakçıklı, kılçıklı ve sıkı kavuzlu (kabuklu) bir yapıya sahiptir. Yapısı sayesinde hastalıklara ve zararlılara dayanıklı ve bu yüzden çoğunlukla ilaçlamaya ihtiyaç duymayan, sert iklim koşullarında yetişebilen, yoksul topraklara ekolojik adaptasyonu yüksek, düşük girdi ihtiyacına sahip ve rekabet gücü yüksek bir türdür. Bununla birlikte, kabuğunun kalın olması sebebiyle siyez buğdayının hasadı ve işlenmesi zor olup, modern buğdaya göre tane verimi düşük ve pişirme özellikleri

zayıftır. Bu dezavantajları sebebiyle siyez buğdayı dünyada yaygın üretilen bir buğday türü değildir. Ülkemizdeki üretimi de sınırlı olup en çok Kastamonu ilinde geleneksel bir ürün olarak üretilmektedir. Ülkemizdeki siyez buğdayı yetiştiricilerinin büyük çoğunluğu (%86) ev ihtiyacını karşılamaya yönelik un ve erişte yapımında kullanmak üzere üretim yapmaktadır. Piyasadaki talep yetersizliği ve pazarlama problemi sebebiyle rekoltesi düşük olan siyez buğdayı çoğunlukla bulgur (%32) ve hayvan yemi olarak (%68) değerlendirilmekte, sınırlı sayıdaki siyez ununun ise iç ve dış pazarda ticari satışı gerçekleşmektedir. Dünya siyez unu ihracatında 2021 yılında ülkemizin %24,5 pay ile ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (Csákvári ve ark, 2021; Karabak ve ark, 2019; Yaman ve ark, 2020).

Siyez buğdayı diploid yapısıyla poliploid yapıdaki buğdaylara kıyasla zengin besin içeriği ile bilinmektedir. Kepekli siyez unu diyet lif içeriği açısından çok zengin olmamasına karşın yüksek protein içeriği (ekmeklik buğdayın yaklaşık iki katı), zengin makro ve mikro elementleri (karotenoidler, mineraller, tokoller), yağ (çoğunlukla doymamış yağ asidi) ve iz element (çinko ve demir) içeriği ile üstün bir besin kalitesi sergilemektedir. Siyez tanesinde protein karbonhidrattan sonra en fazla bulunan bileşen olup içerik olarak %13,2 ile %28,5 arasında değiştiği bildirilmektedir (Zaharieva ve Monneveux, 2014). Abdel-Aal ve Hucl (2002) siyez buğdayının toplam esansiyel amino asit içeriğinin modern buğdaya çok yakın olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte siyez, depo proteini yapısındaki başlıca amino asit olan glutamik asitce zengin ve lisince fakirdir. Son yıllarda sağlıklı beslenme ve kaliteli besin üretimine yönelik artan ilgi sebebiyle, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileriyle bilinen bu antik buğday çeşidi dikkatleri yeniden üzerine çekmiştir (Birinyi ve ark, 2022; Hidalgo ve Brandolini, 2008; Hidalgo ve Brandolini, 2014; Nakov ve ark, 2018).

Bitkisel kaynaklı proteinlerden BAP üretimi üzerine birçok araştırma mevcuttur. Buna karşın literatürde siyez proteinlerinin hidrolizi ile BAP üretimi üzerine bir araştırmaya rastlanmamıştır. Beyaz/rafine un üretiminde buğdayın öğütülmesi sırasında yan ürün olarak elde edilen ruşeymin değerlendirilmesi üzerine bazı BAP üretim çalışmaları mevcuttur. Bu doğrultuda gerçekleştirilen araştırmalarda buğday ruşeymi ticari proteazlar ile hidroliz edilmiş ve elde edilen hidrolizatların antioksidan, antikanser ve ADE inhibitör aktivite taşıdığı rapor edilmiştir (Cheng ve ark, 2006; Karami ve ark, 2019; Matsui ve ark, 1999; Zhu ve ark, 2006). Bu bağlamda, ülkemizdeki üretimi dünya geneline göre fazla olan; ancak yüksek protein içeriğine karşın yüksek katma değerli

ürün eldesinde kullanılmayan siyez proteinleri üzerine yapılan araştırmaların yetersiz olduğu görölmektedir.

Di Stasio ve ark. (2020) siyez ve durum buğdayı (makarnalık buğday) proteinlerini immünolojik özellikleri açısından çölyak hastaları için karşılaştırmıştır. Bu amaçla buğdaydan ekstrakte edilen gliadin proteini gastrointestinal sistemi taklit eden koşullarda pepsin ve kimotripsin enzimi ile sindirime uğratılmıştır. Bulgular, durum buğdayının *in vitro* gastrointestinal sindirimden neredeyse etkilenmediğini, siyez buğdayının ise sindirime karşı belirgin bir duyarlılık taşıdığını göstermiştir. Böylece siyez buğdayı çölyak hastaları için daha düşük bir toksisite sergilemiştir. Bir başka çalışmada Perçin ve Karakaya (2020) siyez buğdayı ile ekmeklik buğdayın sindirim özelliklerini karşılaştırmış, bu doğrultuda bilgisayar simölasyonu ile (*in silico*) ve pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kullanarak buğday proteinlerinin gastrointestinal sindirimini gerçekteşirmiştir. Bulgular, siyez ve ekmeklik buğday proteinlerinden elde edilen BAP'ların çoğunlukla dipeptit yapıda olduğunu ve ADE inhibitör, DPP IV inhibitör ve antioksidan özellik gibi birden fazla biyoaktivite sergilediğini göstermiştir. *In silico* gastrik sindirim sonucu iki buğday türünde de toksik peptitlerin oluşumu gözlenmiş; ancak bu peptitlerin *in silico* bağırsak sindirimi sonrasında yok olduğu tespit edilmiştir. Özetle, literatürde siyez proteinlerinin immünolojik özelliklerinin belirlenmesini amaçlayan araştırmalar mevcut olup, yüksek katma değerli ürün geliştirmeye yönelik BAP üretim çalışması bulunmamaktadır.

3. BİTKİSEL PROTEİNLERDEN FARKLI PROTEAZLAR İLE BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

3.1. Giriş

Biyoaktif peptitler (BAP), gıda proteinlerinden enzimatik hidroliz, mikrobiyel fermentasyon veya kimyasal sentez gibi farklı yöntemlerle üretilen ve sağlık açısından faydalı özellikler sergileyen kısa peptit zincirleridir (Daliri ve ark, 2017; Zarei ve ark, 2012). Bu peptitler, antioksidan, antimikrobiyel, antihipertansif ve bağışıklık düzenleyici gibi geniş bir biyoaktif yelpazeye sahiptir ve bu özellikleri sayesinde gıda, ilaç ve biyoteknoloji endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gürkan, 2019). BAP üretiminde en yaygın yöntemlerden biri olan enzimatik hidroliz, hem doğal bir biyokimyasal süreç olması hem de hedeflenen biyoaktivitelere sahip peptitlerin kontrollü şekilde elde edilmesine olanak tanınması nedeniyle tercih edilmektedir (Dávalos ve ark, 2004). Bu yöntemle özellikle gastrointestinal enzimler, bakteriyel ve fungal proteazlar gibi çeşitli enzimler kullanılarak proteinlerin hidrolizi gerçekleştirilir ve istenen biyoaktif peptitler açığa çıkar. Örneğin, tripsin ve pepsin gibi proteolitik enzimlerin kombinasyonları ile elde edilen peptitlerin antioksidan ve ADE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibitör özellikleri, literatürde sıkça yer almaktadır (Irshad ve ark, 2015).

BAP üretim süreçlerinde kullanılan substratın tipi ve proteazların seçimi, üretilen peptitlerin biyoaktivitesini ve fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Jemil ve ark, 2017; Yi ve ark, 2017). Örneğin, tahıllar, süt, et, deniz ürünleri ve hatta gıda atıkları gibi farklı protein kaynakları BAP üretiminde substrat olarak kullanılabilir ve bu kaynaklardan elde edilen peptitlerin biyolojik özellikleri farklılık gösterebilir (Cian ve ark, 2012). Enzimatik hidroliz koşulları, proteazın türü, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve hidroliz süresi gibi parametreler, üretilen peptitlerin moleküler ağırlığını ve biyoaktivitesini doğrudan belirler (Lassoued ve ark, 2015). Daha kısa peptit zincirlerinin genellikle daha yüksek biyoyararlanım ve emilim kabiliyeti gösterdiği bilinmektedir ve bu da BAP'ların insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini artırmaktadır (Parhizkari ve ark, 2019).

Sonuç olarak, BAP'ların biyomedikal ve endüstriyel uygulamalardaki önemi ve potansiyeli giderek artmaktadır. Bu peptitlerin üretiminde kullanılan enzimatik hidroliz, mikrobiyel fermantasyon ve kimyasal sentez yöntemlerinin her biri farklı avantajlar ve sınırlamalar sunmaktadır (Akhtar ve ark, 2024). BAP'ların biyoaktivitesini artırmak ve ticari olarak uygun hale getirmek için doğru substrat ve hidroliz koşullarının belirlenmesi kritik bir rol oynamaktadır (Fajardo-Espinoza ve ark, 2020). Gıda ve ilaç endüstrisinde geniş bir uygulama potansiyeline sahip olan bu peptitlerin üretimi, sağlık ve beslenme alanında önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır (Zhang ve ark, 2019b).

Çalışmanın bu kısmında, çeşitli bitkisel unların biyoaktif özellikte hidrolizat eldesinde protein öncülü olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Protein izolasyonu alkali solvent yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon koşullarının protein verimine etkisi incelenmiştir. Enzimatik hidroliz uygulamasında çeşitli ticari proteazlar kullanılmış, bununla birlikte laboratuvar koşullarında üretilen *Bacillus* sp. ham enziminin hidrolizde kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Ayrıca, ham enzimin bazı aktivite özellikleri ortaya konmuştur. Üretilen hidrolizatların antioksidan özellikleri *in vitro* spektrofotometrik yöntemler ile tespit edilmiş, fizikokimyasal ve teknofonksiyonel özellikleri ortaya konmuştur.

3.2. Materyal ve Yöntem

Ferene (3-(2-Piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazin-5',5''-disülfonik asit disodyum tuzu) demir(II) klorür (FeCl_2), kazein ve trizma base Sigma-Aldrich (Louis, ABD) tarafından temin edilmiştir. Nutrient broth (NB), nutrient agar (NA), L-tirozin, sodyum dodesil sülfat (SDS), disodyum EDTA (Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat), Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR), 2-merkaptotanol ve Coomassie Brilliant Blue-R-250 Merck (Darmstadt, Almanya) tarafından; sığır serum albümini (BSA), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)), 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Dalton Mark VII-L standardı ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) tarafından temin edilmiştir. Alcalase® 2.4 L FG, Flavourzyme® 1000 L, Neutrase® 0.8 L ve rTrypsin ticari proteazları Novozymes (Bagsvaerd, Danimarka) tarafından; yağsız süt tozu Milkon (Sakarya, Türkiye) tarafından temin edilmiştir. Hidrolizasyon çalışmalarında protein öncülü olarak kullanılmak üzere yerel marketlerden bazı tahıl ürünleri temin edilmiştir. Bu ürünler

siyez unu, kuru fasulye unu (ön pişirilmiş), sarı mercimek unu (ön pişirilmiş), karabuğday (greçka) ve beyaz kinoadır. Ayrıca, yaz sezonu süresince farklı yerel marketlerden galya kavunu (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) temin edilmiş ve çalışmada kavunun çekirdek kısmı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları, firma ve menşei.

Cihaz	Marka-model
Blender	Waring (ABD)
Çalkalamalı inkübatör	Benchmark Incu-Shaker Mini (Kore)
FTIR spektroskopisi	Shimadzu IR, Prestige 21 (Japonya)
Hassas terazi	Radwag AS 220.R2 (Polonya)
Homojenizatör	IKA T25 digital ULTRA TURRAX (Almanya)
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 6 (ABD)
Otoklav	WiseClave WAC-80 (Kore)
pH-metre	Mettler-Toledo SevenCompact S210 (Çin)
Santrifüj	Hettich Universal 320 R (Almanya)
Su banyosu	WiseBath WSB-30 (Kore)
UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu UVmini-1240 (Japonya)
Zetasizer nano series	Malvern Instruments (Birleşik Krallık)

3.3. Bitkisel Protein Kaynaklarının Hazırlanması

Temin edilen kavunlara ait çekirdekler etli kısımdan ayrılmış ve çekirdek etrafındaki lifli yapılar el ile seçilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sırasıyla çeşme suyu ve distile su ile yıkanan çekirdekler 40 °C’deki etüvde kuruyana dek bekletilmiş ve laboratuvar tipi blender ile öğütülmüştür. Öğütülmüş kavun çekirdeği elekten geçirilerek (kare gözenekli, kenar uzunluğu 18 mesh) kabuk kısmı ortamdan uzaklaştırılmış ve kavun çekirdeği unu (KÇU) elde edilmiştir. Elde edilen un ve kabuk kısım tartılarak % oranları belirlenmiştir. Karabuğday (KBU) ve beyaz kinoa (BKU) taneleri ise öğütülerek un haline getirilmiştir. Kuru fasulye unu (KFU), sarı mercimek unu (SMU) ve siyez unu (SU) kullanılmadan önce herhangi bir işleme tabii tutulmamıştır. Tüm un örnekleri çalışma süresince karanlık ve serin bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.3.1. Kimyasal kompozisyon analizleri

Un örneklerinin kimyasal kompozisyonu AOAC uluslararası standart yöntemine göre toplam kuru madde, protein, yağ ve kül tayini yapılarak belirlenmiştir (AOAC, 2005). Analizler en az iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Toplam kuru madde içeriğinin belirlenmesinde 3 gram örnek 105 °C'deki etüvde 4 saat kurumaya bırakılmıştır. Sabit tartıma gelen örneklerin kuru madde içeriği formül 3.1'e göre hesaplanmıştır (AOAC, 2005).

$$\% \text{ Kuru madde} = \frac{\text{Kuru ağırlık (g)}}{\text{Yaş ağırlık (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

Toplam protein içeriği Kjeldahl azot analizi ile belirlenmiştir (AOAC, 2005). Buna göre 0,25-0,50 g örnek için sırasıyla yakma, distilasyon ve titrasyon gerçekleştirilmiştir. Örneklerin toplam azot içeriği formül 3.2'ye göre hesaplanmıştır. Azot faktörü 5,7 alınarak örneklerin toplam protein içeriği belirlenmiştir (formül 3.3).

$$\% \text{ Azot} = \frac{V_1 - V_2}{\ddot{O}} \times N \times 0,014 \times 100 \quad 3.2$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Azot} \times 5,7 \quad 3.3$$

V₁: Esas deneme için titrasyonda harcanan 0,1 N H₂SO₄ miktarı (mL)

V₂: Şahit deneme için titrasyonda harcanan 0,1 N H₂SO₄ miktarı (mL)

N: Titrasyonda kullanılan H₂SO₄ çözeltisinin kesin normalitesi

Ö: Örnek miktarı (g)

Yağ tayini Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (AOAC, 2005). Beş g örnek 200 mL çözügen ile 5-10 saat süresince ekstrakte edilmiştir (300 damla/dk). Çözügen olarak KFU ve SMU için aseton:hekzan (1:4) karışımı; BKU, KBU, KÇU ve SU için ise petrol eteri kullanılmıştır. Rotary evaporatör ile ortamdaki çözügen 50 °C'de yağ ekstraktından uzaklaştırılmış ve ekstraksiyon balonu sabit tartıma getirildikten sonra un örneklerinin toplam yağ içeriği hesaplanmıştır (3.4).

$$\% \text{ Yağ} = \frac{\text{Yağ miktarı (g)}}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100 \quad 3.4$$

Un örneklerinin toplam kül (mineral) içeriğinin belirlenmesi için sabit tartıma getirilen porselen krozelere 5 g örnek tartılmış ve etil alkol ile ön yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 550 °C'deki kül fırınında 6-8 saat bekletildikten sonra desikatöre alınmış ve sabit tartımdaki krozelerin kül içeriği hesaplanmıştır (3.5) (AOAC, 2005).

$$\% \text{ Kül} = \frac{\text{Kül miktarı (g)}}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100 \quad 3.5$$

Un örneklerinin toplam karbonhidrat içeriği (kuru ağırlık bazında) formül 3.6 yardımıyla hesaplanmıştır (FAO, 2003).

$$\text{Karbonhidrat (100 g KM'de)} = 100 - (\text{protein} + \text{yağ} + \text{kül}) \quad 3.6$$

3.3.2. Bitkisel proteinlerin izolasyonu

Protein izolatları Karaca ve ark. (2011) tarafından bildirilen yönteme göre izoelektrik noktada çöktürme işlemi ile ekstrakte edilerek elde edilmiştir. Elli g un 1 L'lik Erlenmeyer içerisinde 500 mL distile su ile karıştırılmıştır (1:10, a/h). Süspansiyonun pH değeri 0,1 M NaOH ile 9'a ayarlanmış ve oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 3 saat yavaşça karışmaya bırakılmıştır. Santrifüj işlemi ile karışıma ait sıvı üst faz ortamdan toplanmış (25 °C, 8965 xg, 5 dk) ve filtre kâğıdından geçirilmiştir. Filtrat pH'ı 4 M HCl ile her bir örnek için izoelektrik noktaya ayarlanmıştır. Buna göre BKU pH 4,5 (Elsahaimy ve ark, 2015); KBU 4,0 (Tomotake ve ark, 2002); KÇU 4,0 (Faiad ve ark, 2019); KFU 4,3 (Pusztai, 1972); SMU 4,2 (Jarpa-Parra ve ark, 2014) ve SU 4,0 (Ge ve ark, 2000) pH değerine ayarlanmıştır. Daha sonra örnekler santrifüj edilerek üst faz ortamdan uzaklaştırılmış (4 °C, 8965 xg, 10 dk) ve geriye kalan çökelti/pellet liyofilizatörde kurutulmuştur (Ge ve ark, 2000). İzolatların protein içeriği Bölüm 3.3.1'de belirtildiği şekilde Kjeldahl azot analizi ile belirlenmiş (AOAC, 2005) ve ardından ekstraksiyon verimi formül 3.7'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{100 \text{ g undan elde edilen izolatın protein miktarı (g)}}{100 \text{ g unun protein miktarı (g)}} \times 100 \quad 3.7$$

3.4. Protein İzolatlarının Ticari Proteazlar ile Hidrolizi

Altı farklı bitkisel kaynaktan ekstrakte edilen protein izolatları (BKU, KBU, KÇU, KFU, SMU ve SU) dört farklı ticari proteaz ile (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase ve Trypsin) hidroliz edilmiştir. İzolatların potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH 7) son konsantrasyon 50 mg/mL olacak şekilde çözündürülmesiyle substratlar hazırlanmıştır. Proteolitik aktivitenin gerçekleşmesi için her bir substrata tüm proteazlar %5 E/S (h/h) oranında ayrı ayrı ve tekli şekilde eklenmiştir. Enzim-substrat

karişımı 50 °C'deki su banyosunda 2 saat inkübe edilerek (100 dev/dk) proteolitik tepkime sağlanmıştır. Enzimatik tepkimenin durdurulması için E-S karişımı 100 °C'deki su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Farklı enzim ve substrat kombinasyonları ile elde edilen hidrolizatlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Bitkisel protein izolatlarının ticari proteazlar ile hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlar.

Substrat	Enzim	Hidrolizat	Substrat	Enzim	Hidrolizat
Beyaz kinoa unu	Alcalase	BKU-Al	Kuru fasulye unu	Alcalase	KFU-Al
	Flavourzyme	BKU-Fl		Flavourzyme	KFU-Fl
	Neutrased	BKU-Ne		Neutrased	KFU-Ne
	rTrypsin	BKU-Ty		rTrypsin	KFU-Ty
Karabuğday unu	Alcalase	KBU-Al	Sarı mercimek unu	Alcalase	SMU-Al
	Flavourzyme	KBU-Fl		Flavourzyme	SMU-Fl
	Neutrased	KBU-Ne		Neutrased	SMU-Ne
	rTrypsin	KBU-Ty		rTrypsin	SMU-Ty
Kavun çekirdeğı unu	Alcalase	KÇU-Al	Siyez unu	Alcalase	SU-Al
	Flavourzyme	KÇU-Fl		Flavourzyme	SU-Fl
	Neutrased	KÇU-Ne		Neutrased	SU-Ne
	rTrypsin	KÇU-Ty		rTrypsin	SU-Ty

3.4.1. Hidrolizatların antioksidan özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında hidroliz edilen bitkisel proteinler içerisinde antioksidan özellikte peptit oluşturma potansiyeline sahip olanlar belirlenmiştir. Bu amaçla Tablo 3.2'de belirtilen 24 adet protein hidrolizatının DPPH gideriminin belirlenmesi ile antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikalının giderim aktivitesinin belirlenmesi için Osukoya ve ark. (2020) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Yöntem, kararlı ve sentetik bir radikal olan DPPH'in antioksidan madde tarafından indirgenmesi sonucu koyu mor renginin açılması esasına dayanmaktadır. Absorbanstaki azalma 517 nm'de ölçülerek DPPH giderimi belirlenmektedir. Buna göre hidrolizattan 0,1 mL alınarak 3 mL DPPH çözeltisine (0,05 mM, %70 etanolde) aktarılmış ve vorteks ile 30 sn karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 40 dk bekletildikten sonra örnekler santrifüj edilmiştir (4 °C, 8965 xg, 5 dk). Üst faz pipet ile toplandıktan sonra UV-Vis spektrofotometre ile 517 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Hidrolizatların % DPPH giderim aktivitesi formül 3.8'e göre belirlenmiştir. ($A_{\text{Ömek}} = 0,1 \text{ mL hidrolizat} + 3 \text{ mL DPPH}$, $A_{\text{Kontrol}} = 0,1 \text{ mL distile su} + 3 \text{ mL DPPH}$, $A_{\text{Kör}} = 0,1 \text{ mL hidrolizat} + 3 \text{ mL \%70 etanol}$)

$$\% DPPH \text{ giderimi} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{Örnek}} - A_{\text{Kör}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \right) \times 100 \quad 3.8$$

Aktivite bulgularına göre DPPH giderimi en fazla olan hidrolizat tespit edilmiş ve hidrolizatın üretiminde kullanılan protein öncülü bitki, protein ekstraksiyonu optimizasyon çalışması için seçilmiştir.

3.4.2. Protein ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Biyoaktif peptit üretiminde kullanılmak üzere seçilen un örneğinden alkali solvent yöntemiyle protein izolasyonunda ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla ekstraksiyon koşullarından katı madde/çözgen oranı ve pH değerlerinin protein kazanımına olan etkisi incelenmiştir. İlk olarak ekstraksiyon pH değerinin etkisi araştırılmış, bunun için üç farklı alkali pH değerinde (pH 8, 9, 10) çalışılmıştır. Un-su süspansiyonu %10 (a/h) konsantrasyonunda hazırlandıktan sonra pH 0,1 M NaOH ile 8, 9 ve 10'a ayarlanmıştır. Proteinler Bölüm 3.3.2'de açıklandığı şekilde izole edildikten sonra, en yüksek ekstraksiyon verimi ve % protein içeriğine sahip hidrolizata ait pH değeri optimum olarak seçilmiştir. Katı madde/çözgen oranının etkisinin belirlenmesi amacıyla un-su süspansiyonu %10, %20 ve %30 (a/h) oranında hazırlanmış, bu oranlar pelte oluşumunun gözlenmediği ve süspansiyon yapının korunduğu ön çalışma sonucu seçilmiştir. Un-su karışımının pH'ı 0,1 M NaOH ile daha önce belirlenen optimum değere ayarlanmış ve proteinler benzer şekilde ekstrakte edilmiştir. Farklı pH ve katı madde/çözgen oranında elde edilen izolatların protein içeriği ve ekstraksiyon verimi Bölüm 3.3.2'de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Protein içeriği ve ekstraksiyon verimi en yüksek olan izolata ait ekstraksiyon koşulları optimum koşullar olarak seçilmiş ve çalışmanın ilerleyen kısmında protein ekstraksiyonu bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Bakteriyel ham proteaz üretimi için mikroorganizma tarama çalışması

Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen proteinlerin biyolojik ve teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla proteinler dört farklı ticari proteaz (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Trypsin) ile hidroliz edilmiştir. Bununla birlikte, laboratuvar koşullarında izole edilen bazı *Bacillus* suşlarının proteaz üretim yeteneği ve ham proteazın substrat üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

Proteaz üretim yeteneğinde olan mikroorganizmaların tespiti için çeşitli gıda ve toprak örneklerinden izole edilen ve Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda muhafaza edilen sekiz farklı *Bacillus* suşu seçilmiştir. Bakteri izolatlarının proteaz üretim yeteneği, süt tozu içeren katı besiyerindeki gelişimleri gözlenerek belirlenmiştir. Bu amaçla gliserol çözeltisinde muhafaza edilen stok kültürden (%25 h/h, -45 °C) steril koşullarda üç mikro litre alınarak süt tozu ile hazırlanmış katı besiyerine (%1 yağsız süt tozu ve %1,5 agar agar) aktarılmış ve inkübe edilmiştir (35 °C, 24 sa). İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonilerinin etrafında şeffaf zon yapısının varlığı gözlenmiş ve zon çapı cetvel ile ölçülmüştür (mm). Zon çapı büyük olan *Bacillus* suşları proteaz üretim yeteneği iyi olarak değerlendirilmiş ve proteaz aktivitesinin tespit edilmesi amacıyla bir sonraki çalışma için seçilmiştir.

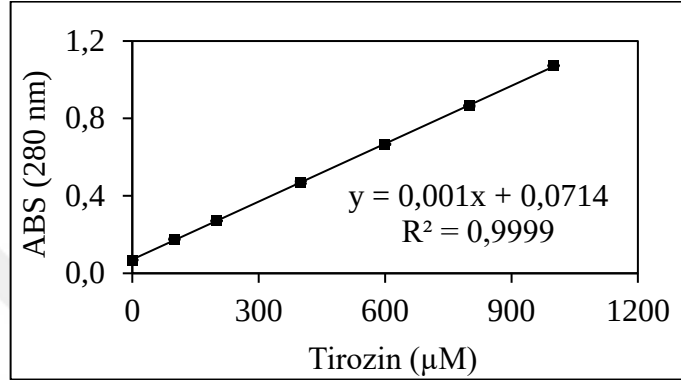
3.4.4. *Bacillus* sp. EBTA7 ile proteaz üretimi ve enzimin özelliklerinin belirlenmesi

Proteaz üretim potansiyelinin yüksek olduğu gözlenen *Bacillus* sp. EBTA7 ile proteaz üretilmiş ve enzimin özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla %50 gliserol çözeltisindeki stok kültürden bir öze dolusu alınarak nutrient agara çizme yöntemiyle ekilmiş ve kültür gelişmek üzere 35 °C'deki inkübatörde bir gece (18-24 sa) bekletilmiştir. Gelişen kültüre ait tek bir koloniden bir öze dolusu alınarak 500 mL Erlenmeyer içerisindeki 300 mL nutrient brotha steril koşullarda aşılanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde 48 saat inkübasyonun ardından (35 °C, 120 dev/dk) bakteri hücreleri santrifüj ile çöktürülerek uzaklaştırılmış (4 °C, 8965 xg, 20 dk) ve sıvı üst faz toplanarak proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.4.4.1. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Proteaz aktivitesi, Prakasham ve ark. (2006) tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Substrat olarak %1 (a/h) konsantrasyondaki kazein çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için kazein Tris-HCl tampon çözeltisinde (100 mM, pH 8) %1 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanmış ve süspansiyon 80 °C'deki su banyosunda 10 dk bekletilerek çözünme sağlanmıştır. Tepkimenin gerçekleşmesi için 0,1 mL ham proteaz 1 mL substrat ile karıştırılmış ve 60 °C'deki su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir. Tepkimeyi sonlandırmak için örnekler hızlıca buz banyosuna alınmış ve ortama 2 mL TCA (%10 a/h) eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Ortamdaki fazla proteinler santrifüj ile çöktürülmüş (8965 xg, 4 °C, 5 dk) ve üst fazın

absorbans değeri UV-Vis spektrofotometre ile 280 nm’de ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak enzim yerine 0,1 mL distile su kullanılmıştır. Amino asit standardı olarak tirozin kullanılmış, bu amaçla tirozin Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 8) çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0-1000 µM). Tirozin dilüsyonlarının absorbans değeri spektrofotometre ile 280 nm’de ölçülmüş ve değişen tirozin konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tirozin standart eğrisi.

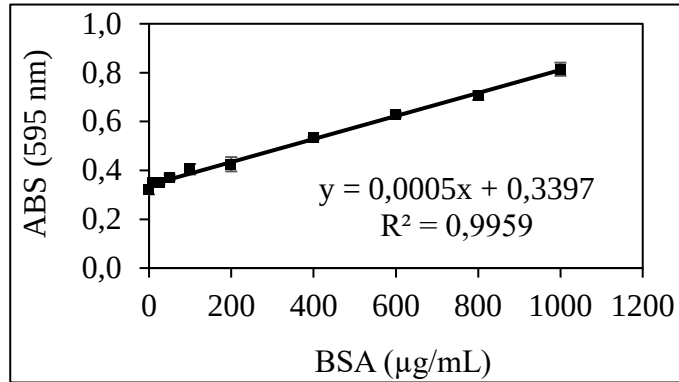
Standart eğriye ait denklem kullanılarak, enzimin substratı hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amino asit miktarı µM tirozin eş değeri olarak hesaplanmıştır. Enzimin 1 dakikada serbest bıraktığı mikro mol (µmol) tirozin miktarı 1 ünite proteaz aktivitesi (U) olarak ifade edilmiştir. Buna göre, proteaz aktivitesi formül 3.9’a göre hesaplanarak U/mL cinsinden verilmiştir.

$$Proteaz\ aktivitesi\ \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{Tirozin\ eş\ değeri\ (\mu M) \times Toplam\ hacim\ (mL)}{Enzim\ miktarı\ (mL) \times Tepkime\ süresi\ (dk)} \quad 3.9$$

3.4.4.2. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Ham proteazın protein içeriği Bradford (1976) tarafından bildirilen yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla 50 µL enzim 2,5 mL Bradford reaktifine ilave edilip vorteks ile karıştırılmış ve 5 dk bekledikten sonra örneklerin absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 595 nm’de ölçülmüştür. Protein standardı olarak bovin serum albümini (BSA) kullanılmış (0-1000 µg/mL) ve en az beş farklı konsantrasyonda hazırlanan BSA için elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Ham proteazın toplam protein içeriği eğriye ait denklem kullanılarak hesaplanmış ve mg/mL BSA eş değeri olarak verilmiştir. Enzimin proteaz aktivitesi

(U/mL) belirlendikten sonra spesifik aktivite 1 mg proteinin 1 dakikada serbest bıraktığı μ mol tirozin miktarı (U/mg) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. BSA standart eğrisi.

3.4.4.3. Enzimin optimum pH ve sıcaklığının belirlenmesi

Enzimler substrat üzerinde işlev gösterebilmek için bazı özgün koşullara ihtiyaç duymaktadır. Enzimatik tepkimenin gerçekleşeceği ortamın pH ve sıcaklığı, E/S oranı, inkübasyon süresi ve tampon çözelti konsantrasyonu gibi bazı tepkime koşullarının proteaz aktivitesi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Shu ve ark, 2016). Bu koşullardan pH ve sıcaklığın proteaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiş, bu amaçla proteolitik tepkime farklı pH (7-11) ve sıcaklık (50-80 °C) değerlerinde gerçekleştirilerek en yüksek proteaz aktivitesinin elde edildiği koşullar optimum olarak belirlenmiştir. Optimum pH değerinin belirlenmesi için substrat olarak kullanılan kazein çözeltisi (%1, a/h) pH 7, 8, 9, 10 ve 11 olmak üzere beş farklı tampon çözeltide (100 mM) hazırlanmıştır. Proteaz aktivitesi analizi Bölüm 3.4.4.1’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen en yüksek proteaz aktivitesine ait tepkime pH değeri optimum olarak seçilmiştir. Tepkime ortamı sıcaklığının proteaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için kazein çözeltisi daha önce belirlenen optimum pH değerinde hazırlanmış ve enzim ilave edildikten sonra 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C’deki su banyosunda dört ayrı sıcaklık değerinde tepkimeye sokulmuştur. Proteaz aktivitesi analizi benzer şekilde gerçekleştirilmiş ve en yüksek proteaz aktivitesi değerinin tespit edildiği tepkime sıcaklığı optimum değer olarak belirlenmiştir. Kazein çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan tampon çözeltiler aşağıda verilmiştir.

pH 7 - Fosfat tamponu (100 mM): 9,344 g K_2HPO_4 ve 6,308 g KH_2PO_4 800 mL distile suda çözündürüldükten sonra 1 L’lik balon jode çizgisine tamamlanmıştır.

pH 8 - Tris-HCl tamponu (100 mM): 12,114 g Trizma base 800 mL distile suda çözüldürüldükten sonra 4 M HCl ile pH'ı 8'e ayarlanmış ve 1 L'lik balon jode çizgisine tamamlanmıştır.

pH 9 - Tris-HCl tamponu (100 mM): 12,114 g Trizma base 800 mL distile suda çözüldürüldükten sonra 4 M HCl ile pH'ı 9'a ayarlanmış ve 1 L'lik balon jode çizgisine tamamlanmıştır.

pH 10 - Glisin-NaOH tamponu (100 mM): 7,52 g glisin ve 2,56 g NaOH 800 mL distile suda çözüldürüldükten sonra 4 M NaOH ve 4 M HCl ile pH'ı 10'a ayarlanmış ve 1 L'lik balon jode çizgisine tamamlanmıştır.

pH 11 - Glisin-NaOH tamponu (100 mM): 7,52 g glisin ve 2,56 g NaOH 800 mL distile suda çözüldürüldükten sonra 4 M NaOH ve 4 M HCl ile pH'ı 11'e ayarlanmış ve 1 L'lik balon jode çizgisine tamamlanmıştır.

3.4.4.4. Ham proteaz üretiminde kullanılan bakteri izolatının tanımlanması

Bacillus sp. izolatı Gram boyama, spor boyama ve katalaz testi ile morfolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından tanımlanmıştır. Ayrıca, izolatın moleküler düzeyde tür tayini için hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. 27F – 1492R primerleriyle, tür tayini için 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmış (27F: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT) ve Sanger Dizileme yöntemi ile dizi analizi yapılmıştır (Chauhan ve Jindal, 2020). Çoğaltılan 16S rDNA gen dizisi (1409 adet baz) BLASTN 2.16.1+ programı kullanılarak veri tabanındaki (bakteri ve arke) bakteri türleri ile karşılaştırılmış, bakterinin *Bacillus* türleri ile olan benzerlik oranı filogenetik olarak belirlenmiştir (Morgulis ve ark, 2008; Zhang ve ark, 2000).

3.5. Direkt Hidroliz ile Siyez Protein Hidrolizatlarının Üretimi

Siyez proteinlerin enzimatik hidrolizi, *Bacillus* sp. izolatından elde edilen ham proteaz ve dört ticari proteaz olan Alcalase, Flavourzyme, Neutrase ve rTrypsin'in ayrı ayrı kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Katı haldeki rTrypsin fosfat tamponunda (100 mM, pH 7) çözüldürüldükten sonra (%1 a/h) kullanılmıştır. Substrat, siyez ununun tampon çözeltide %30 (a/h) oranında süspanse edilmesiyle hazırlanmıştır. Tampon olarak ticari proteazlar için pH 7 (100 mM potasyum fosfat) ve ham proteaz için pH 9 (100 mM Tris-HCl) çözeltileri kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonu, un-çözelti karışımının pelte yapı kazanmadığı en yüksek konsantrasyon olarak seçilmiş ve bu

oran (%30 a/h) bir ön çalışma ile belirlenmiştir. Hazırlanan süspanse karışım enzim ilave edilmeden önce oda sıcaklığında yavaşça çalkalanarak 20 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Substratlara her bir enzim iki farklı oranda ve ayrı ayrı ilave edilmiştir. Buna göre ticari enzimler ile 0,25:100 ve 1:100 (mL enzim:g siyez unu); ham proteaz ile 50:100 ve 100:100 (mL enzim:g siyez unu) konsantrasyonunda enzim-substrat karışımı hazırlanmıştır. Proteolitik tepkime ticari proteazlar için 50 °C (pH 7) ve ham proteaz için 60 °C'de (pH 9) gerçekleştirilmiş, bu koşullar ticari proteazlar için literatürde bildirilen optimum çalışma aralığında ve ham proteaz için Bölüm 3.7.5.3'teki çalışmaya ait bulgular göz önünde bulundurularak seçilmiştir. E/S karışımı çalkalamalı su banyosunda (110 rpm) 2 saat inkübe edilerek proteolitik tepkimenin meydana gelmesi sağlanmıştır. Tepkimenin sonlandırılması için örnekler 95 ± 5 °C'deki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnekler santrifüj edilerek çözünmeyen bileşenler çöktürülüp ortamdaki uzaklaştırılmış (8965 xg, 4 °C, 30 dk) ve sıvı üst faz toplanmıştır. Çözünür proteinleri ve peptitleri içeren sıvı faz liyofilizatör ile kurutulmuş (0,045 mbar, -45 °C) ve elde edilen hidrolizatlar biyolojik ve teknolojik özellikleri belirlenmek üzere -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Hidrolizde kullanılan enzim türü, E/S oranı ve hidrolizat kodları Tablo 3.3'te verilmiştir.

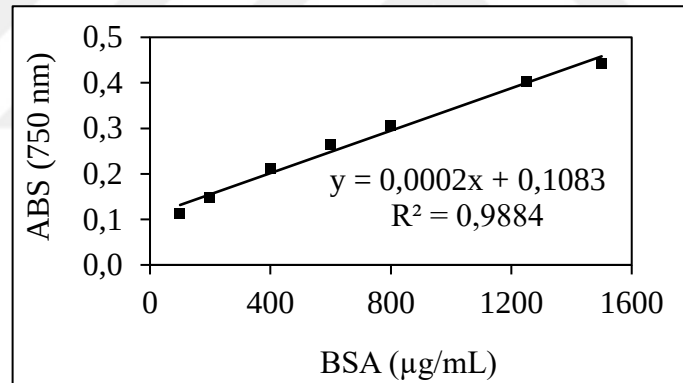
Tablo 3.3. Siyez unundan beş farklı proteaz ile iki farklı E/S oranında üretilen hidrolizatlar.

Enzim	E/S (mL enzim:g siyez unu)	Hidrolizat kodu
Alcalase	0,25:100	A1
	1:100	A2
Flavourzyme	0,25:100	F1
	1:100	F2
Neutrase	0,25:100	N1
	1:100	N2
Trypsin	0,25:100	T1
	1:100	T2
<i>Bacillus</i> sp. izolatu tarafından üretilen ham proteaz	50:100	B1
	100:100	B2

3.5.1. Hidroliz derecesinin belirlenmesi

Hidroliz derecesi (HD), %10 (a/h) trikloroasetik asit (TCA)'teki çözünür protein içeriğinin, hidrolizatın toplam protein içeriğine oranı ile belirlenmiştir (Hoyle ve Meritt, 1994). Analiz öncesi tüm hidrolizatlar pH tamponunda çözündürülmüştür (10-12,5 mg/mL). Çözünür proteinlerin elde edilmesi için hidrolizat ile TCA çözeltisi

(%20 a/h) 1:1 oranında (h/h) karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Çözünmeyen proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması için karışım santrifüj edilmiş (8965 xg, 4 °C, 15 dk) ve süpernatant toplanarak çözünür proteinler olarak elde edilmiştir. Hidrolizatın toplam ve çözünür protein içeriği Lowry yöntemi ile belirlenmiştir (Lowry ve ark, 1951). Buna göre 0,2 mL örnek ile 1 mL Lowry çözeltisi karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (distile su ile 1 N'a seyreltilmiş) ilave edilmiştir. Vortekslenen örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Absorbans değerleri ölçülmeden önce tüm örnekler 5 mL distile su ilavesi ile seyreltilmiş ve UV-Vis spektrofotometre ile 750 nm'de absorbans ölçülmüştür. Protein standardı olarak BSA kullanılmış, bu amaçla BSA distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (100-1500 µg/mL). BSA'nın toplam protein içeriği Lowry yöntemi ile yukarıda belirtildiği şekilde analiz edilmiş ve değişen BSA konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. BSA standart eğrisi.

Hidrolizatlara ait toplam ve çözünür protein içeriği standart eğriden elde edilen denklem (Şekil 3.3) kullanılarak µg BSA eş değeri/mL cinsinden hesaplanmış ve ardından formül 3.10 ile hidroliz derecesi belirlenmiştir.

$$\%HD = \frac{\text{Çözünür protein}}{\text{Toplam protein}} \times 100 \quad 3.10$$

3.5.2. Hidrolize Proteinlerin Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi), proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Analiz, Laemmli

(1970) yöntemine göre ve dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE analizi ile hidrolize proteinlerin moleköl ağırlıklarına göre ayrımı sağlanmıştır. Jel içeriği Tablo 3.4'te belirtilmiştir (jel konsantrasyonu: %20-4, kaset kalınlığı: 1 mm, kaset boyutu: 10x10 cm). Hidrolizat ve örnek tamponu 1:1 oranında (h/h) karıştırıldıktan sonra 95 ± 2 °C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Jele 15 µL örnek yüklenmiş ve 200 V potansiyel gerilim altında siyez hidrolizatı proteinlerinin ayrışması sağlanmıştır. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı aşağıda açıklanmıştır.

Yükleme jeli tamponu (1,0 M Tris-HCl, pH 6,8): 6,054 g Trizma Base 30 mL distile suda çözündürüldükten sonra 3,6 mL konsantre HCl (%37) ilave edilmiştir. pH değeri 4 N HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra çözelti 50 mL'lik balon jojede distile su ile çizgisine tamamlanmıştır.

Ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8): 9,075 g Trizma Base 30 mL distile suda çözündürüldükten sonra 0,8 mL konsantre HCl (%37) ilave edilmiştir. pH değeri 4 N HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra çözelti 50 mL'lik balon jojede distile su ile çizgisine tamamlanmıştır.

Akrilamid:bis-akrilamid çözeltisi (%40): 38,93 g akrilamid ve 1,07 g N,N'-Metilen bisakrilamid 100 mL distile suda çözündürülmüştür. Kaba filtre kağıdı ile filtre edildikten sonra koyu renki cam şişeye aktarılıp 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (%30, a/h): 1,5 g amonyum persülfat (APS) 5 mL distile suda çözündürülmüştür. Her analiz öncesi taze hazırlanan çözelti kullanılmıştır. %10 APS eldesi için %30 APS distile su ile 1:3 oranında seyreltilmiştir.

Sodyum dodesil sülfat (%20, a/h): 2 g sodyum dodesil sülfat (SDS) 10 mL distile suda çözündürülmüştür.

Örnek tamponu (1x, pH 6,75): 0,378 g Trizma Base, 20 mL gliserol ve 8,75 mL distile su karıştırılmıştır. 4 N HCl ile pH 6,75'e ayarlanmıştır. Karışıma 2 g SDS, 5 mL 2-merkaptoetanol ve 0,5 mg bromophenol mavisi eklenmiştir. Çözelti 50 mL'lik balon jojede distile su ile çizgisine tamamlanmıştır.

Yürütücü tampon (tank tamponu) (10x): 3,03 g Trizma Base, 14,4 g glisin ve 1 g SDS 800 mL distile suda çözündürüldükten sonra çözelti 1000 mL'lik balon jojede distile su ile çizgisine tamamlanmıştır (pH 8,3). Her analiz öncesi 10x tank tamponu distile su ile 10 katına seyreltildikten sonra (1x konsantrasyonda) kullanılmıştır.

Boyama çözeltisi: 1 g Coomasie Brilliant Blue-R-250 150 mL etanolde çözündürüldükten sonra 50 mL glasiyal asetik asit ve 300 mL distile su ile karıştırılmış ve kaba filtre kağıdı ile süzölmüştür.

Boya uzaklaştırma çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 200 mL etanol ve 700 mL distile su karıştırılmıştır.

Örneklerin hazırlanması: Hidrolizatlar 5-15 mg hidrolizat/mL tampon konsantrasyonunda olacak şekilde uygun pH'daki potasyum fosfat tamponunda (pH 7 veya pH 9) çözöndüröldükten sonra örnek tamponu ile 1:1 oranında (80 µL örnek + 80 µL örnek tamponu) karıştırılmış ve 95 ± 2 °C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir.

Marker'ın hazırlanması: -45 °C'de muhafaza edilen marker çözöndüröldükten sonra örnek tamponu ile 1:1 oranında (80 µL marker + 80 µL örnek tamponu) karıştırılmış ve 95 ± 2 °C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir.

Jel dökme: Dikey elektroforez sistemine, 1 mm kalınlıkta ve boyutları 10x10 cm olan cam kasetler etil alkol ile temizlenip kurulandıktan sonra küvete yerleştirilmiştir. Ayrım jeli çözeltileri Tablo 3.4'te belirtilen hacimlerde 50 mL'lik beher içeresine aktarılıp karıştırılmış ve otomatik pipet yardımıyla kasetlerin arasına kaset seviyesinin yaklaşık 2/3'ü olacak şekilde aktarılmıştır. Yüzeyde oluşın köpüklerin kırılması ve polimerizasyon sırasında kurumının önüne geçilmesi amacıyla karışımın üzerine etil alkol ilave edilmiş ve yaklaşık 15 dk polimerizasyon için düzenek ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Jel oluşumu gerçekleştikten sonra etil alkol ortamdan uzaklaştırılmış ve kasetlerin ara yüzeyi filtre kağıdı ile kurulanmıştır. Ayrım jelinin üzerine yükleme jeli çözeltileri ile benzer şekilde hazırlanan karışım dökölmüştür. Jel üzerinde yürüme kanallarının oluşturulması için 1 mm'lik kasetler ile uyumlu bir tarak kasetlerin üstüne yerleştirilmiş ve üst jel katılaşıana dek (1-1,5 saat) bekletilmiştir. Üst jel katılaştıktan sonra kaset çiftleri arasına ve tank haznesine tank tamponundan (1x) yüzeye ulaşana dek dökölmüş tarak yavaşça ve kuyucuklara zarar vermeden çıkarılmıştır.

Örneklerin yüklenmesi: Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan örnekler ile marker bir mikropipet yardımı ile kuyucuklara 15 µL olacak şekilde yüklenmiştir. Elektroforez sistemi güç kaynağına bağlanmış ve iki jelde de 200 V şiddetinde akım sağlanmışır. Yaklaşık 1 saat sonra işaretçi boya alt jelin bitiş seviyesinin yaklaşık 2 cm üzerindeyken yürütme durdurulmuştur.

Proteinlerin boyanması: Kasetler sistemden çıkarıldıktan sonra arasındaki jel kesilerek alınmış ve distile su ile birkaç kez yıkanmıştır. Ardından boyama çözeltisinin içerisine konmuş ve oda sıcaklığındaki çalkalamalı inkübatörde (25 rpm) bir gece bekletilerek jelin boyanması ve proteinlerin görünür hale geçmesi sağlanmıştır.

Jeldeki boyanın uzaklaştırılması: Boyanan jeller sırasıyla distile su ve yıkama çözeltisinde birkaç dakika bekletildikten sonra yıkama çözeltisi içerisine alınmış ve oda sıcaklığındaki çalkalamalı inkübatörde (25 rpm) jel şeffaf hale gelene kadar (bir gece) bekletilmiştir.

Tablo 3.4. SDS-PAGE jel içeriği.

Ayrım Jeli (Alt Jel)		Yükleme Jeli (Üst Jel)	
Deiyonize su	3 mL	Deiyonize su	4,875 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6,5 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	625 µL
%40 Akrilamid/bis	10 mL	%40 Akrilamid/bis	625 µL
%20 SDS	500 µL	%20 SDS	125 µL
%10 APS	200 µL	%30 APS	80 µL
TEMED	100 µL	TEMED	40 µL

3.5.3. Hidrolizatların biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi

Hidrolizatların antioksidan aktivitesi *in vitro* yöntemler ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda DPPH ve ABTS serbest radikalini giderim aktivitesi, demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi ve toplam fenolik madde içeriği belirlenmiştir.

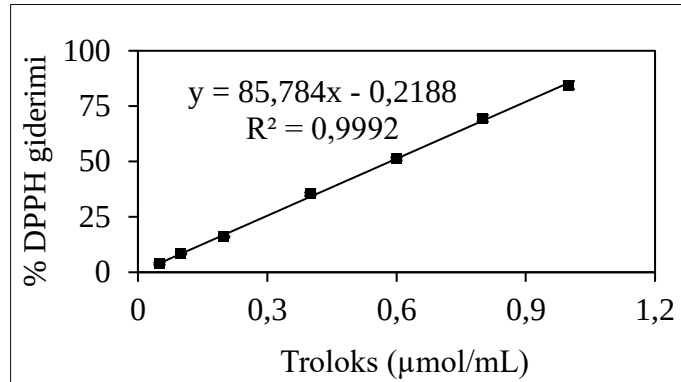
3.5.3.1. DPPH gideriminin belirlenmesi

DPPH serbest radikalının giderim aktivitesi Bölüm 3.4.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Osukoya ve ark, 2020). Hidrolizatların % DPPH giderim aktivitesi formül 3.11’e göre belirlenmiştir. ($A_{\text{Örnek}} = 0,1$ mL hidrolizat + 3 mL DPPH, $A_{\text{Kontrol}} = 0,1$ mL distile su + 3 mL DPPH, $A_{\text{Kör}} = 0,1$ mL hidrolizat + 3 mL %70 etanol)

$$\% \text{ DPPH giderimi} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{Örnek}} - A_{\text{Kör}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \right) \times 100 \quad 3.11$$

Antioksidan standardı olarak troloks kullanılmış, bu amaçla troloks etil alkolde çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0,05-1 µmol/mL). Troloksun DPPH giderimi yukarıda belirtildiği şekilde analiz edilerek % aktivite değeri hesaplanmış ve değişen troloks konsantrasyonuna karşı elde edilen % DPPH giderimi ile standart eğri oluşturulmuştur

(Şekil 3.4). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların DPPH giderim aktivitesi μmol troloks eş değeri (TE)/g örnek (km) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.4. Troloks standart eğrisi (DPPH).

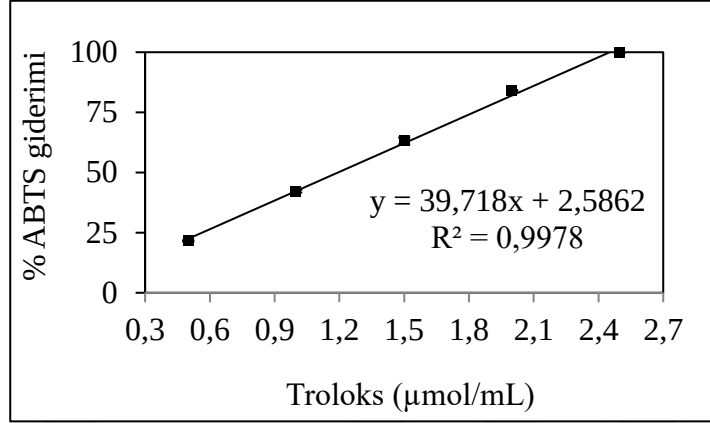
3.5.3.2. ABTS gideriminin belirlenmesi

ABTS radikal giderim aktivitesi Re ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Yöntem, ABTS (2,2'-azonobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) ile potasyum persülfatın oksidasyonu sonucu oluşan $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katyonunun antioksidan madde ile tepkimeye girmesi sonucu azalan renk yoğunluğunun 734 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla 7 mM ABTS stok çözeltisi 2,45 mM potasyum persülfat ile 1:1 oranında (h/h) karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 16 saat bekletilmiştir ($\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikalinin oluşumu için). $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikali, UV-Vis spektrofotometre ile 734 nm'deki absorbans değeri $0,700 \pm 0,0005$ ölçülene kadar fosfat tamponlu tuzlu su (pH 7,4) ile seyreltilmiştir. Hidrolizattan 50 μL alınarak 3 mL $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikaline aktarılmış ve vorteks ile birkaç saniye karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 6 dk bekletilmesinin ardından örnekler için absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 734 nm'de ölçülmüştür. Kontrol için örnek yerine aynı hacimde distile su kullanılmıştır. Hidrolizatların % ABTS giderim aktivitesi formül 3.12'ye göre belirlenmiştir.

$$\% \text{ ABTS giderimi} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad 3.12$$

Antioksidan standardı olarak troloks kullanılmış, bu amaçla troloks etil alkolde çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0,5-2,5 $\mu\text{mol/mL}$). Troloksun ABTS giderimi yukarıda belirtildiği şekilde analiz edilerek % aktivite değeri hesaplanmış ve değişen troloks

konsantrasyonuna karşı elde edilen % ABTS giderimi ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların ABTS giderim aktivitesi $\mu\text{mol TE/g örnek (km)}$ olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Troloks standart eğrisi (ABTS).

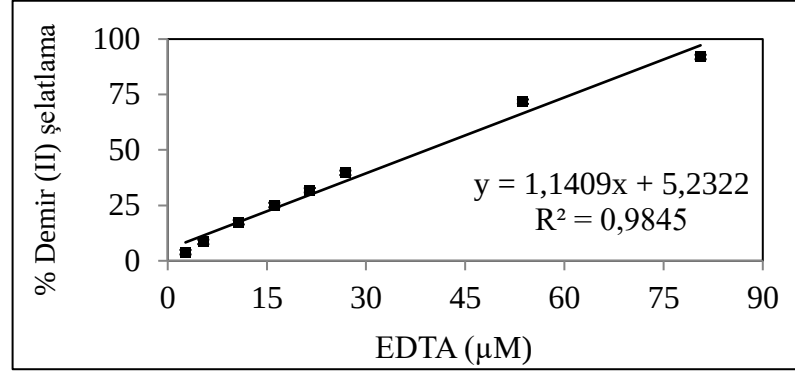
3.5.3.3. Demir (II) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

Peptitlerin şelatlama (minerel bağlayıcı) aktivitesi demir (II) iyonu (Fe^{+2}) bağlama kapasitesinin ölçülmesi esasıyla belirlenmiştir. Bu amaçla Ferhat ve ark. (2016) tarafından bildirilen yöntem uygun değişiklikler uygulandıktan sonra kullanılmıştır. Yöntem demir (II) iyonunun ferene kromojeni ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan mavi renkli kararlı yapıdaki kompleks bileşiğin (şelat) renk yoğunluğunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Gulcin ve Alwasel, 2022). Hidrolizatlar uygun tampon çözelti ile 10 mg/mL son konsantrasyonunda hazırlandıktan sonra 0,8 mL örnek 0,4 mL FeCl_2 çözeltisi (0,2 mM) ile karıştırılmıştır. Şelatlama tepkimesini başlatmak için ortama 0,8 mL ferene çözeltisi (0,5 mM) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra UV-Vis spektrofotometre ile 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol için örnek yerine aynı hacimde tampon çözelti kullanılmıştır. Hidrolizatların demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi formül 3.13’e göre belirlenmiştir.

$$\% \text{Şelatlama} = \left(\frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100 \quad 3.13$$

Şelatör standardı olarak EDTA disodyum tuzu kullanılmış, bu amaçla EDTA distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0-90 μM). Standartın şelatlama aktivitesi yukarıda belirtildiği şekilde analiz edilerek % aktivite değeri hesaplanmış ve değişen EDTA konsantrasyonuna

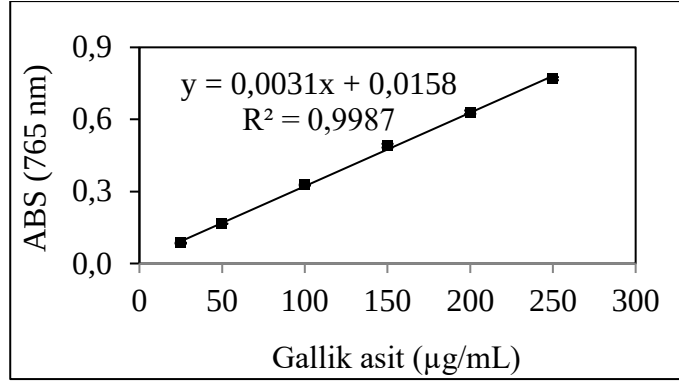
karşı elde edilen % şelatlama aktivitesi ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.6). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi mg EDTA eş değeri/g örnek (km) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.6. EDTA standart eğrisi.

3.5.3.4. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi

Toplam fenolik madde (TFM) içeriği, Singleton ve Rossi (1965) tarafından bildirilen yöntemle göre Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak belirlenmiştir. Uygun oranda seyreltilmiş hidrolizattan 100 µL alınarak 200 µL FCR ve 2 mL distile su ile karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 3 dk bekletilmiştir. Karışıma 1 mL sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi (%20 a/h) ilave edildikten sonra örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dk inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 765 nm'de ölçülmüştür. Fenolik bileşik standardı olarak gallik asit kullanılmış, bu amaçla gallik asit distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (25-250 µg/mL). Gallik asidin TFM içeriği yukarıda belirtildiği şekilde analiz edilerek absorbans değerleri 765 nm'de ölçülmüş ve değişen gallik asit konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.7). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların TFM içeriği mg gallik asit eş değeri (GAE)/g örnek (km) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. Gallik asit standart eğrisi.

3.5.4. Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi

3.5.4.1. Emülsiyon özelliklerinin belirlenmesi

Hidrolizatların emülsiyon oluşturma özellikleri Pearce ve Kinsella (1978) tarafından bildirilen yöntemle belirlenmiştir. Buna göre 1 g hidrolizat 30 mL pH tamponunda (pH 7 ve pH 9) karıştırıldıktan sonra üzerine 10 mL ayçiçek yağı ilave edilmiştir. Karışım 20,000 rpm hızındaki homojenizatör ile 1 dk homojenize edilmiştir. Homojenize haldeki emülsiyonun dibine bir pipet daldırılarak 0. ve 10. dakikada 50 µL örnek alınmış ve 5 mL %0,1 (a/h) sodyum dodesil sülfat (SDS) içerisine aktarılmıştır. Karışım 15 sn vorteksledikten sonra UV-Vis spektrofotometre ile 500 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Kör olarak %0,1 SDS kullanılmıştır.

Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) sırasıyla formül 3.14 ve 3.15’e göre belirlenmiştir (Pearce ve Kinsella, 1978). A emülsiyonun 500 nm’deki absorbans değeri, DF dilüsyon faktörü, I küvetin ışık yolu (m), ϕ yağ hacim fraksiyonu (0,25), C sıvı fazdaki protein konsantrasyonudur (g/m³). $\Delta A = A_0 - A_{10}$ ve $\Delta t = 10$ dakikadır.

$$EAI (m^2/g) = [2 \times 2,303 \times A \times DF] / [I \times \phi \times C] \quad 3.14$$

$$ESI (dk) = A \times \Delta t / \Delta A \quad 3.15$$

3.5.4.2. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi

Hidrolizatların yağ tutma kapasitesi Aydemir ve Yemenicioğlu (2013) tarafından bildirilen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Buna göre 2 mL hacmindeki santrifüj tüplerinin darası alındıktan sonra içerisine 50 mg hidrolizat tartılmış ve üzerine 1,5 mL ayçiçek yağı ilave edilmiştir. Karışım 20 sn vorteksledikten sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler yağ ayrımı için

santrifüj edilmiş (12,000 xg, 20 dk, oda sıc.) ve üst faz pastör pipeti ile toplanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tüpler kapakları açık halde baş aşağı konumda 30 dk bekletilerek kalan yağın uzaklaşması sağlanmış ve sonra tekrar tartılmıştır. Yağ tutma kapasitesi g yağ/g hidrolizat olarak hesaplanmıştır.

3.5.4.3. Köpürme özelliklerinin belirlenmesi

Hidrolizatların köpürme kapasitesi Senadheera ve ark. (2023) tarafından rapor edilen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Elli mL hacmindeki Falcon tüp içerisine 100 mg ($\pm 0,5$ mg) hidrolizat tartılmış ve üzerine 20 mL 100 mM pH tamponu (pH 7 ve pH 9) eklenmiştir. Karışım 10,000 rpm hızındaki homojenizatör ile 2 dk karıştırılmıştır (Prob: S25N). Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi sırasıyla formül 3.16 ve 3.17'ye göre belirlenmiştir.

$$\text{Köpürme kapasitesi (\%)} = \left[\frac{(A_0 - B)}{B} \right] \times 100 \quad 3.16$$

$$\text{Köpük stabilitesi (\%)} = \left[\frac{(A_{30} - B)}{(A_0 - B)} \right] \times 100 \quad 3.17$$

A₀: Çırpma işleminden hemen sonraki hacim (mL), A₃₀: Çırpma işleminden 30 dk sonraki hacim (mL), B: Çırpma işleminden önceki hacim (mL).

3.5.4.4. Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi

Hidrolizatlar Fourier Dönüşümü kızılötesi (infrared) (FTIR) spektroskopi analizi ve zeta potansiyelinin belirlenmesi ile fiziksel ve kimyasal özellikleri için karakterize edilmiştir. Infrared (IR) spektroskopisi, biyolojik yapıların incelenmesinde, özellikle proteinlerin konformasyonel analizinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Proteinlerin doğal yapısını incelemeye ve ortamın protein yapısı üzerindeki etkisini değerlendirmeye olanak tanıyan bu tekniğin başlıca avantajı, yöntemin protein molekülünün büyüklüğünden veya numunenin fiziksel durumundan bağımsız olmasıdır. IR spektroskopisi ile sulu filmler ve katı hal kolayca incelenebilirken, aynı zamanda sulu çözeltiler, organik çözücüler, deterjanlar, miseller ve fosfolipid membranlar da incelenebilmektedir (Barth, 2007; Usoltsev ve ark, 2019; Zeeshan ve ark, 2018). Ticari enzimler ile üretilen hidrolizatların moleküler yapısını karakterize etmek ve spesifik kimyasal bağları ve fonksiyonel grupları tanımlamak için FTIR spektroskopisi kullanılmış ve analiz 4000-500 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında

gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatların zeta potansiyeli ölçümlerinde zeta potansiyeli analizörü kullanılmıştır. On mg hidrolizat bir mili litre distile su içerisinde süspanse edilmiş ve süspanسیون, hidrolizatın sulu ortamda düzgün bir şekilde dağılmasını sağlamak için 5 dk boyunca vorteksle karıştırıldıktan sonra ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

Bütün analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel veri analizi IBM SPSS Statistics 20 programı ile yapılmıştır. Grup ortalamalarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Çoklu grup karşılaştırmalarında homojen varyanslar için Tukey, homojen olmayan varyanslar için Games-Howell post hoc testleri $p < 0,05$ önem düzeyinde uygulanmıştır.

3.7. Bulgular ve Tartışma

3.7.1. Bitkisel unların kimyasal kompozisyonu

Protein öncülü olarak seçilen altı farklı un örneğinin kimyasal kompozisyonu Tablo 3.5'te verilmiştir. Örneklerin nem içeriği %6,0 (KÇU) ile %11,3 (KBU), protein içeriği KM'de %11,5 (KBU) ile %30,9 (KÇU), yağ içeriği KM'de %1,9 (SMU) ile %41,8 (KÇU), kül içeriği KM'de %2,1 (BKU, SU) ile %5,8 (KÇU) ve karbonhidrat içeriği KM'de %21,5 (KÇU) ile %83,3 (KBU) arasındadır.

Tablo 3.5. Bitkisel un çeşitlerinin kimyasal bileşen dağılımı.

Un Çeşidi	Nem (g/100 g un)	Protein (g/100 g KM) (x 5,7)	Yağ (g/100 g KM)	Kül (g/100 g KM)	Karbonhidr at (g/100 g KM)
Beyaz kinoa unu	10,2 $\pm$ 0,0 ^b	11,8 $\pm$ 0,5 ^c	5,6 $\pm$ 0,0 ^b	2,1 $\pm$ 0,0 ^c	80,5
Karabuğday unu	11,3 $\pm$ 0,0 ^a	11,5 $\pm$ 0,1 ^c	3,0 $\pm$ 0,2 ^c	2,2 $\pm$ 0,1 ^c	83,3
Kavun çekirdeği unu	6,0 $\pm$ 0,1 ^c	30,9 $\pm$ 0,3 ^a	41,8 $\pm$ 0,1 ^a	5,8 $\pm$ 0,1 ^a	21,5
Kuru fasulye unu	6,4 $\pm$ 0,1 ^c	19,7 $\pm$ 0,6 ^b	2,7 $\pm$ 0,1 ^d	3,2 $\pm$ 0,0 ^b	74,4
Sarı mercimek unu	6,4 $\pm$ 0,2 ^c	21,3 $\pm$ 0,2 ^b	1,9 $\pm$ 0,0 ^f	2,2 $\pm$ 0,0 ^c	74,6
Siyez unu	10,0 $\pm$ 0,1 ^b	12,5 $\pm$ 0,4 ^c	2,3 $\pm$ 0,1 ^e	2,1 $\pm$ 0,0 ^c	83,1

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).

Kavun çekirdeği unu tüm un çeşitleri arasında en yüksek protein içeriğine sahip olup (%30,9) KÇU'yu sarı mercimek unu (%21,3) takip etmektedir. Kavun çekirdeği yüksek protein ve yağ içeriğinde, özellikle zengin yağ asidi ve fitokimyasal bileşen

profili sayesinde besleyici özelliği ile dikkat çeken tarımsal atıklardandır (Chen ve ark, 2021; Olubunmi ve ark, 2019). Raji ve Orelaja (2014) ayıklanmış ve kurutulmuş kavun çekirdeğinin kimyasal kompozisyonunu %7,45 su, %21,05 protein, %31,86 yağ, %3,23 kül ve %37,08 karbonhidrat olarak; Mallek-Ayadi ve ark. (2018) %7,16 su, %27,41 protein, %30,65 yağ, %4,83 kül ve %29,96 karbonhidrat (KM'de) olarak bildirmiştir. Bu çalışmada 100 g kurutulmuş kavun çekirdeğinden 42 g un ve 56 g kabuk elde edilmiştir. Kabuk kısmı ayrılan KÇU'nun toplam protein (%30,9), yağ (%41,8) ve kül (%5,8) içeriği çalışma kapsamında analiz edilen tüm un türlerinden ve diğer literatür bulgularından daha yüksek, kabuk kısmı analiz öncesinde ayrıldığı için karbonhidrat içeriği (%21,5) daha düşük tespit edilmiştir.

Baklagiller ve tahıl ürünleri gibi bitkisel ürünlerin içeriğindeki bileşenler bitkinin çeşidine ve yetiştirme koşullarına göre farklılık göstermektedir (Zhou ve ark, 2013). Besleyici özellikleri ile bilinen baklagiller protein, diyet lifi ve nişasta bileşenlerince zengindir. Baklagiller yüksek protein içerikleri (%22-28) sebebiyle birincil protein kaynağı görevi görse de kuru fasulye tanesinin ana bileşenini karbonhidratlar oluşturmaktadır. Baklagil karbonhidratlarının büyük kısmını nişasta (%45-60) ve diyet lifi (%4-10) oluşturmaktadır. Kuru fasulye kuru ağırlık bazında %60-70 karbonhidrat, %20-25 protein, %1-3 yağ ve yüksek kül içeriği (%2,0-4,5) ile aynı zamanda çok iyi bir mineral kaynağıdır (Sathe ve ark, 1984; Shimelis ve Rakshit, 2005; Şahin ve Karakas, 2022). ABD Tarım Bakanlığı Tarım Araştırma Hizmeti veri tabanına göre 100 g kuru fasulyede (navy bean) 24,1 g protein, 1,51 g yağ ve 42,4 g karbonhidrat bulunmaktadır (United States Department of Agriculture [USDA], 2024).

Buğday, pirinç, mercimek ve mısır dünyada en yaygın tüketilen tahıl tanelerinin başında gelmektedir. Mercimek, diğer tahıllara kıyasla daha yüksek protein ve düşük karbonhidrat içeriği ile dikkat çeken bir baklagildir (Dhull ve ark, 2023). Mercimek tanesi kompozisyonunun çeşidine ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak %15,9-31,4 protein, %43,4-74,9 karbonhidrat, %0,3-3,5 yağ ve %2,2-6,4 kül arasında değiştiği bildirilmiştir (Grusak, 2009). USDA (2024) ise pembe/kırmızı mercimek bileşimini 100 g KM'de ortalama 7,82 g su, 23,9 g protein, 2,17 g yağ, 3 g kül ve 63,1 g karbonhidrat olarak rapor etmiştir.

Bazı bitkiler baklagil sınıfına dâhil olmayıp, tahıllar ile hem benzerlik hem de farklılık göstermektedir. Karabuğday, kinoa ve amarant bu gruba dâhil olup, bu bitkilerin tohumları tahıl ürünlerine benzer şekilde öğütülerek un eldesinde kullanılabilir.

(Hayıt ve Gül, 2017). Bu özellikleri sebebiyle bu bitkiler sözde (yalancı) tahıl (pseudo-cereal) olarak adlandırılmaktadır. Sözde tahıllardan karabuğdayın tane bileşimi çalışma kapsamında %12-18,9 protein, %59-70 nişasta, %1,5-4 yağ ve %2-2,5 kül arasında tespit edilmiştir (Christa ve Soral-Şmietana, 2008; Wijngaard ve Arendt, 2006). USDA (2024) verilerine göre karabuğday (tam tane) bileşimi 100 g KM için ortalama 13 g su, 11,1 g protein, 3,04 g yağ, 1,82 g kül ve 71,1 g karbonhidrattan oluşmaktadır. Bir diğer sözde tahıl olan kinoanın kompozisyonu %10-18 protein, %54,1-64,2 karbonhidrat, %4,5-8,75 yağ ve %2,4-3,65 kül olarak bildirilmiştir (Jancurová ve ark, 2009). USDA Tarım Araştırma Hizmeti veri tabanına göre 100 g kinoa unu için kimyasal kompozisyon değerleri yaklaşık olarak 9,95 g su, 11,9 g protein, 6,6 g yağ, 2 g kül ve 69,5 g karbonhidrat olarak bildirilmiştir (USDA, 2024).

Siyez buğdayı, ana vatanı Türkiye olan antik bir buğday çeşidi olup ana bileşenini nişasta oluşturmaktadır. Bununla birlikte çeşidine bağlı olarak geleneksel buğdaydan daha yüksek protein içeriği ile bilinmektedir (Gazza ve ark, 2023). Türkiye menşekli siyez buğdaylarının protein içeriği Brandolini ve ark. (2008) tarafından %15,7-19,4 (KM'de) olarak bildirilmiştir. Mahdavi ve ark. (2024) 100 g tam tane siyez buğdayı bileşimini ortalama 13,8 g su, 18,2 g protein, 2,48 g yağ, 72 g karbonhidrat olarak rapor etmiştir. Genel olarak siyez unu için toplam ham protein içeriği KM'de ortalama %18,1-18,2 olarak belirtilmektedir (Brandolini ve ark, 2008; Grausgruber ve ark, 2004). Çalışma kapsamında siyez unu protein içeriği literatürde bildirilen değerlere kıyasla nispeten düşük tespit edilse de (KM'de %12,5) bu durumun bitki çeşidi ve yetiştirme koşullarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. SU protein içeriği ambalajlı ürünün etiket bilgisi ile uyumlu (12 g protein/100 g un) ve literatürde belirtilen değer aralığı içerisinde (KM'de %10-17,4) (Løje ve ark, 2003).

3.7.2. Farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi

Altı farklı bitkisel undan elde edilen protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi Tablo 3.6'da verilmiştir. Protein içeriği 100 g izolat için KM'de en az 24,7 g (KBU) ve en çok 76,7 g (SMU) tespit edilmiştir. Protein izolatlarının ekstraksiyon verimi %3,6-36,2 aralığında belirlenmiş olup BBU için %22,3; KBU %3,6; KÇU %5,2; KFU %8,9; SMU %36,2 ve SU için %12,5 olarak belirlenmiştir. SMU'dan elde edilen protein izolatı en yüksek ekstraksiyon verimine sahiptir (%36,2) ve ardından BBU takip etmektedir (%22,3).

Tablo 3.6. Farklı bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilen protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.

Protein izolatu (Kaynağına göre)	100 g undan elde edilen protein izolatu (g)	Protein içeriği (g/100 g KM)	Ekstraksiyon verimi (%)
Beyaz kinoa unu	4,7	50,1 ± 0,5 ^d	22,3 ± 0,2 ^b
Karabuğday unu	1,5	24,7 ± 0,1 ^f	3,6 ± 0,0 ^f
Kavun çekirdeği unu	3,2	46,6 ± 0,8 ^e	5,2 ± 0,1 ^e
Kuru fasulye unu	3,1	53,0 ± 0,6 ^c	8,9 ± 0,1 ^d
Sarı mercimek unu	9,4	76,7 ± 0,4 ^a	36,2 ± 0,2 ^a
Siyez unu	2,5	57,2 ± 0,7 ^b	12,5 ± 0,2 ^c

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). (N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

Alkali ekstraksiyon ve izoelektrik noktada çöktürme, bitkisel gıdalardan protein eldesinde en çok kullanılan yöntemdir (Cruz-Solis ve ark, 2023). Jarpa-Parra ve ark. (2014) sarı mercimek unundaki proteinleri distile su ile alkali pH'da ekstrakte etmiş ve oda sıcaklığında gerçekleştirilen çalışmada pH 9 ve 1:10 katı madde/çözgen (g:mL) oranını optimum koşullar olarak bildirmiştir. Aynı çalışmada, bir saat süren ekstraksiyon sonunda 100 g mercimek unundan 14,5 g protein izolatu (%82 protein içeriğinde) elde edilmiştir. Bu çalışmada aynı koşullarda sarı mercimek unundan benzer şekilde yüksek protein içeriğinde (%76,7) izolat elde edilmiştir. İzolat miktarı ise daha az olup (9,4 g) bu durumun ekstraksiyon süresi ve/veya ekstraksiyonda kullanılan unun protein miktarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Seçilen ekstraksiyon yöntemi ve analiz koşulları, proteinlerin yüksek verimde elde edilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Zhu ve ark, 2024). Bitkisel proteinler tuzlar, çözücüler, deterjanlar veya alkali bazlı kimyasallar veya suyun kullanıldığı geleneksel uygulamalarla ekstrakte edilebilmektedir; ancak bu yöntemlerin zaman alıcı olması, çevre dostu olmaması ve düşük ekstraksiyon verimi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Öte yandan, enzim destekli ekstraksiyon ile fiziksel teknikler (ultrason, darbeli elektrik alan uygulaması, mikrodalga, yüksek basınç vb.) gibi modern yöntemler yüksek maliyetleriyle bilinmektedir (Hewage ve ark, 2022; Kumar ve ark, 2021). Bu çalışmada, ekstraksiyon aşamasında zararlı kimyasal kullanımı ile enerji tüketiminin düşük seviyede tutulması hedeflenmiş ve alkali suda çözünür proteinler geleneksel yöntem ile (izoelektrik noktada çöktürme işlemi ile) elde edilmiştir. Geleneksel yöntemde kullanılan çözücü türü, katı madde/çözgen oranı, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi proteinlerin ayrıştırılmasında önemli parametrelerdendir (Jarpa-Parra ve ark,

2014). Bununla birlikte, protein öncülü maddenin kimyasal profili, ham protein içeriği ve azot dönüşüm faktörü de etkilidir (Khan ve ark, 2023). Azot dönüşüm faktörü (ADF) beyaz kinoa ve karabuğday gibi yalancı tahıllar için 5,70-6,25 (Ballester-Sánchez ve ark, 2019; Skrabanja ve ark, 2004); fasulye ve mercimek gibi baklagiller için 5,24-5,67 aralığında bildirilmiştir (Mariotti ve ark, 2008; Yamaguchi, 1992). Bu çalışmada tüm un çeşitleri için ADF 5,7 olarak alınmıştır.

Bazı çalışmalar çözücü türü, katı madde/çözgen oranı, pH vb. koşullar dışında santrifüjleme/çöktürme hızının da proteinlerin ekstraksiyonunda önemli olduğunu göstermektedir. Föste ve ark. (2015) kinoa proteinlerinin alkali solvent (NaOH) ile ekstraksiyonunda artan santrifüj hızına bağlı olarak izolat protein içeriğinin KM'de %58,9'dan %67,9'a yükseldiğini (15,000 RCF) bildirmiştir. Bobkov ve ark. (2018) bir çalışmada pH ve sürenin karabuğday proteinlerinin ekstraksiyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Buna göre pH 8'de 1 saat ve pH 9'da 4 saat ekstraksiyon sonunda elde edilen izolatların protein içeriği belirlenmiş ve pH 9'da daha etkin ekstraksiyon gerçekleştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte iki çalışma arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Proteinlerin ayrıştırılmasında çözücü ortamın pH değeri proteinlerin çözünürlüğü üzerinde doğrudan etkilidir. Alkali ortamda kazanılan yüksek net yük etkisi ile hidrofilik yüzey alanı ve itici kuvvetler artmakta, bu sayede protein-protein etkileşimleri azalırken protein-su etkileşimleri artmaktadır (Kramer ve ark, 2012). Ortama NaOH ilavesi ile ekstraksiyon pH 8-11 aralığında gerçekleştirilebilse de pH 9,0-9,5 aralığında genellikle daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (do Evangelho ve ark, 2017; Vogelsang-O'Dwyer ve ark, 2021). Protein öncülü yapının basit veya kompleks karakterde olması da ayrıştırma işlemi üzerinde etkilidir. Kavun çekirdeği gibi ham lif ve yağ bileşenlerince zengin olan yapılardan protein izolasyonunda bu bileşenlerin ortamdaki öncelikli olarak ayrılması ekstraksiyon üzerinde olumlu etki yaratmaktadır (Zhu ve ark, 2024). Devi ve Badwaik (2021) bütün haldeki kavun çekirdeği tanelerinin 18,75 g/100 g; yağı uzaklaştırılmış çekirdek tanelerinin ise 57,45 g/100 g protein içerdiğini bildirmiş ve yağı ayrılmış kavun çekirdeklerinden yüksek protein içeriğinde izolat elde etmiştir (%77,31). Bu çalışmada kabuk kısmı ayrılan kavun çekirdeğinden elde edilen ekstrakt bileşiminin yaklaşık yarısını proteinler oluşturmaktadır (46,6 g protein/100 g KÇU km).

3.7.3. Ticari proteazlar ile üretilen protein hidrolizatların antioksidan aktivitesi

Antioksidatif etki BAP'ların önemli işlevlerinden olup bu çalışmada BAP üretiminin gerçekleştiğinin belirlenmesinde eleme kriteri olarak kullanılmıştır. Antioksidan aktivite DPPH giderimi ile belirlenmiş ve en iyi aktivite gösteren hidrolizat dikkate alınarak çalışmanın devamında kullanılacak protein öncülü bitki seçilmiştir. Altı farklı bitkisel kaynaktan (BKU, KBU, KÇU, KFU, SMU, SU) elde edilen protein izolatlarının Alcalase, Flavourzyme, Neutrase ve Trypsin enzimleriyle hidrolizi sonucu elde edilen protein hidrolizatlarının DPPH giderim aktivitesi değerleri Tablo 3.7'de verilmiştir. Protein hidrolizatlarının DPPH giderimi en az %5 (KFU-Al, KFU-Ne) ve en çok %73 (SU-Al) tespit edilmiştir. DPPH giderimi protein izolatu türüne bağlı olarak BKU için %38-62; KBU %11-51; KÇU %0-27; KFU %0-25, SMU %0-39 ve SU için %30-73 arasındadır.

Tablo 3.7. Farklı bitkisel proteinlerden ticari proteazlar kullanılarak elde edilen hidrolizatların % DPPH giderim aktivitesi değerleri

	Beyaz kinoa proteini	Karabuğday proteini	Kavun çekirdeği proteini	Kuru fasulye proteini	Sarı mercimek proteini	Siyez proteini
Alcalase	62 ± 2 ^{Ba}	51 ± 0 ^{Ca}	8 ± 2 ^{Eb}	5 ± 3 ^{Fb}	18 ± 0 ^{Db}	73 ± 1 ^{Aa}
Flavourzyme	60 ± 3 ^{Aab}	43 ± 1 ^{Bb}	27 ± 1 ^{Ca}	25 ± 2 ^{Ca}	39 ± 4 ^{Ba}	61 ± 1 ^{Ab}
Neutrase	55 ± 5 ^{Bb}	42 ± 0 ^{Cb}	6 ± 1 ^{Dc}	5 ± 2 ^{Db}	9 ± 3 ^{Dc}	64 ± 3 ^{Ab}
Trypsin	38 ± 1 ^{Ac}	11 ± 4 ^{Cc}	TE	TE	TE	30 ± 3 ^{Bc}

*Küçük harfler aynı sütundaki, büyük harfler aynı satırdaki ortalamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$). (TE: DPPH giderim aktivitesi tespit edilmemiştir.)

Tüm proteazlar içerisinde Alcalase ve Flavourzyme kullanımıyla elde edilen hidrolizatların genel olarak daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Alcalase kullanımı ile elde edilen hidrolizatlar arasında siyez protein hidrolizatı en yüksek aktiviteye sahip olup (%73), kinoa protein hidrolizatı ikinci sırada gelmektedir (%62). Benzer şekilde, Flavourzyme kullanımında da siyez ve kinoa proteinlerinden diğer izolatlara kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip hidrolizat elde edilmiş; ancak bu iki hidrolizatın aktivitesi arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (SU-Fl: %61, BKU-Fl: %60).

Bakliyat proteinlerinin hidrolizinde Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Savinase, trypsin, pepsin, papain, α -chymotrypsin, thermolysin ve bromelain en yaygın kullanılan proteazlar olarak bilinmektedir (Gharibzahedi ve ark, 2024). Hidrolizde kullanılan proteaz türü endo ve ekzo peptidaz olmasına bağlı olarak farklı düzeyde

etkinlik görülmesi sebebiyle kritik bir öneme sahiptir. Proteazların proteolitik aktivitesi, protein zincirlerinin kademeli olarak açılmasını sağlarken yüzey hidrofobisitesini artırmakta ve böylece antioksidan özelliklerin iyileşmesine katkıda bulunmaktadır (Ambigaipalan ve ark, 2015; Kasera ve ark, 2015).

Merkezinde kararlı yapıda azot atomu bulunduran DPPH, eşleşmemiş elektrona sahip bir serbest radikaldir. Ortamda bulunan serbest radikalleri süpürücü (H^+ veren) bileşikler eşleşmemiş elektronları sönmölemektedir. Proteinler hidrolize olduklarında H^+ iyonu bağışlama potansiyelleri artmakta ve bu sayede radikal zincir tepkimelerinin sonlandırılmasıyla oksidatif tahribatın önüne geçilmektedir (Gharibzahedi ve ark, 2019; Xie ve ark, 2019; Zheng ve ark, 2019).

Bu çalışmada kullanılan altı farklı bitkisel protein arasında siyez ve kinoa izolatlarından elde edilen hidrolizatlar önemli düzeyde DPPH giderimi gerçekleştirmiştir. Bu durum iki bitkinin de antioksidan peptit üretiminde uygun birer kaynak olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, siyez hidrolizatlarının daha yüksek aktiviteye sahip olması sebebiyle, antioksidan peptit üretimi çalışmalarında kullanılmak üzere öncü protein (protein kaynağı) olarak siyez unu seçilmiştir.

3.7.4. Farklı koşullarda elde edilen siyez protein izolatlarının ekstraksiyon verimi

Siyez unundan alkali solvent yöntemiyle %10 katı madde/çözgen oranında ve farklı pH (8-10) değerlerinde elde edilen izolatların protein içeriğı ve ekstraksiyon verimi Tablo 3.8’de verilmiştir. İzolatların protein içeriğı pH 8, 9 ve 10 için sırasıyla %62,3; %61,0 ve %64,4 olarak belirlenmiştir. pH 8 ve 9 izolatlarının protein içerikleri arasında anlamlı bir farka rastlanmazken, pH 10 izolatının protein içeriğı en fazladır. Bununla birlikte, ekstraksiyon verimi pH değerindeki artış ile kolerasyon göstermiş ve pH 8, 9 ve 10 için sırasıyla %4,5; %10,9 ve %23,0 olarak tespit edilmiştir. pH 10’da elde edilen izolatın daha fazla protein içermesi ve ekstraksiyon veriminin diğer izolatlara kıyasla önemli düzeyde artmış olması sebebiyle pH 10, protein ekstraksiyonunun en yüksek etkinlikte gerçekleştiğı optimum değer olarak seçilmiştir.

Tablo 3.8. Farklı pH değerlerinde elde edilen siyez protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.

Ekstraksiyon pH'ı	Protein içeriği (%)	Ekstraksiyon verimi (%)
8	62,3 ± 0,5 ^b	4,5 ± 0,0 ^c
9	61,0 ± 1,0 ^b	10,9 ± 0,2 ^b
10	64,4 ± 0,5 ^a	23,0 ± 0,2 ^a

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). (N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

Siyez unundan pH 10'da ve farklı katı madde/çözgen oranında (%10-30) elde edilen izolatların protein içeriği ve ekstraksiyon verimi değerleri Tablo 3.9'da verilmiştir. Buna göre, izolatların protein içeriği %10, %20 ve %30 konsantrasyonları için sırasıyla %58,0; %53,0 ve %44,6 olarak belirlenmiştir. Bulgular, katı madde oranındaki artışa bağlı olarak izolatların protein içeriğinin anlamlı düzeyde azaldığını (p<0,05) ve en fazla protein miktarının (%58) en düşük un konsantrasyonunda (%10) elde edildiğini göstermektedir. İzolatların ekstraksiyon verimi %10, %20 ve %30 için sırasıyla %22,7; %18,9 ve %18,7 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, un konsantrasyonu %10'un üzerine çıkıldıkça ekstraksiyon verimi azalmış; ancak %20 ve 30 için verimde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0,05). Böylece, %10 un konsantrasyonunda (a/h) ekstrakte edilen izolatın protein içeriği ve ekstraksiyon veriminin anlamlı ölçüde daha yüksek olması sebebiyle %10 değeri optimum olarak seçilmiştir. Sonuç olarak, çalışılan parametreler içerisinde siyez proteinlerinin pH 10 ve %10 katı madde/çözgen oranında en yüksek kapasitede izole edildiği tespit edilmiştir.

Tablo 3.9. Farklı katı madde/çözgen oranlarında elde edilen siyez protein izolatlarının protein içeriği ve ekstraksiyon verimi.

Katı madde/çözgen	Protein içeriği (%)	Ekstraksiyon verimi (%)
%10	58,0 ± 1,1 ^a	22,7 ± 0,4 ^a
%20	53,0 ± 0,6 ^b	18,9 ± 0,2 ^b
%30	44,6 ± 1,9 ^c	18,7 ± 0,8 ^b

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). (N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

Buğday proteinleri genel olarak iki ana grup altında ifade edilmektedir: prolamin grubu ve prolamin olmayan grup. Prolamin grubu, gliadin ile glüteninden oluşmakta olup bu proteinler endospermde depo proteini görevi görmektedir. Prolamin olmayan grup ise albüminler (suda çözünür proteinler) ile globülinleri (tuzlu suda çözünür

proteinler) içermektedir. Albümin ve globülinler buğday unu proteinlerinin %10-30'luk kısmını oluşturmakta ve çoğunlukla embriyoda ve aleuron tabakasında bulunmaktadır. Bu proteinler dengeli bir beslenme için gerekli olan esansiyel amino asitleri glüten proteinlerine kıyasla daha fazla içermesi sebebiyle önem taşımaktadır (Belderok ve ark, 2000; Merlino ve ark, 2009; Oszvald ve ark, 2014; Žilić ve ark, 2011). Albüminlerin çimlenmekte olan embriyo için besin rezervi olma, böceklerle ve patojen mantarlara karşı savunmada ve tane sertliği üzerinde etkili olma gibi rollere sahip olduğuna inanılmaktadır (DuPont ve Altenbach, 2003; Morris, 2002). Ayrıca enzimler ve enzim inhibitörleri olarak da işlev görmektedirler (Kodama ve ark, 2005). Bazı yüksek molekül ağırlıklı albüminlerin ve bazı globülin proteinlerinin yapısal, koruyucu ve metabolik işlevlerinin yanı sıra depolama işlevine de sahip olduğu düşünülmektedir (Dinesh ve Singh, 2011; Dong ve ark, 2012). Beslenme açısından, albümin ve globülin proteinlerinin amino asit bileşimleri açısından üstün özellikte olduğu kabul edilmektedir. Bu protein fraksiyonları, gliadin ve glütenin proteinlerine kıyasla daha yüksek lisin ve metiyonin içeriğine sahiptir (Lasztity, 1984). En yaygın albümin ve globülin proteinleri α -amilaz/tripsin inhibitörleri, serpinler ve purotiyoninlerdir (DuPont ve Altenbach, 2003).

Bu çalışmada kullanılan siyez ununun 100 g'ının 12,5 g protein (KM'de) içerdiği tespit edilmiştir. Buğday proteinlerinin yaklaşık %20'lik kısmının albümin ve globülinlerden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda, optimum koşullarda ekstrakte edilen siyez proteinlerinden suda çözünür proteinlerin tamamına yakın bir kısmının ekstrakte edildiği düşünülmektedir.

3.7.5. Ham proteazın özellikleri

3.7.5.1. *Bacillus* suşunun seçilmesi

Süt tozu ile hazırlanan besiyerindeki gelişimi sırasında bakteri proteaz salgılamakta ve süt proteini olan kazein proteaz tarafından parçalanmaktadır. Böylece koloni etrafında şeffaf zon oluşumu gözlenerek bakterinin proteaz salgılama potansiyeli belirlenmektedir. Test edilen 8 farklı *Bacillus* izolatına ait şeffaf zon çapı uzunlukları Tablo 3.10'da verilmiştir. En uzun zon çapı ZGT9 izolatı için tespit edilmiş (20,0 mm) ve sırasıyla EBTA7 (18,8 mm), ZBP10 (18,5 mm) ve EKT1 (18,3 mm) için gözlenmiştir. ZBP4 izolatı en düşük çap uzunluğuna sahiptir (11 mm) ($p < 0,05$). Genel olarak, test edilen 8 adet bakteri içerisinde ZBP4 haricinde bütün suşların proteaz üretim potansiyeli iyi olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.10. *Bacillus* kolonilerinin şeffaf zon çapı uzunlukları.

<i>Bacillus</i> izolatu türü	Zon çapı (mm)
EBTA6	16,5 ± 0,9 ^b
EBTA7	18,8 ± 0,6 ^{ab}
EKT1	18,3 ± 0,8 ^{ab}
GİT2	18,2 ± 2,0 ^{ab}
ZBP4	11,0 ± 1,7 ^c
ZBP10	18,5 ± 0,5 ^{ab}
ZGT9	20,0 ± 1,0 ^a
SBT9	17,2 ± 0,3 ^{ab}

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). (n=3)

3.7.5.2. Ham proteazların proteolitik aktivitesi

Ham proteaz üretiminin gerçekleştirileceği bakteri izolatının seçimi için *Bacillus* sp. EBTA7, EKT1 ve ZGT9 izolatları tercih edilmiştir. Seçilen izolatlar tarafından ham enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve proteaz aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre, *Bacillus* sp. EBTA7, EKT1 ve ZGT9 izolatları tarafından üretilen ham proteazın toplam protein içeriği, proteaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri Tablo 3.11’de verilmiştir. Ham enzim çözeltilisinin toplam protein içeriği EBTA7, EKT1 ve ZGT9 için sırasıyla 182,6; 112,6 ve 127,6 µg/mL’dir. En yüksek proteolitik aktivite sergileyen suş EBTA7 olup (2530,8 U/mL), EBTA7’yi sırasıyla ZGT9 (459,0 U/mL) ve EKT1 (360,8 U/mL) takip etmektedir. Spesifik aktivite proteaz aktivitesine benzer şekilde en yüksek EBTA7 için gözlenmiştir (13862 U/mg). EKT1 (3221 U/mg) ve ZGT9 (3597 U/mg) için EKT1’e kıyasla spesifik aktivite önemli düzeyde düşük olup, bu iki aktivite değeri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05).

Tablo 3.11. *Bacillus* izolatları tarafından üretilen ham proteazların toplam protein içeriği ve proteolitik aktivite değerleri.

<i>Bacillus</i> sp.	Toplam protein içeriği (µg/mL)	Proteaz aktivitesi (U/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)
EBTA7	182,6 ± 2,8 ^a	2530,8 ± 11,7 ^a	13862 ± 215 ^a
EKT1	112,6 ± 11,3 ^c	360,8 ± 14,6 ^c	3221 ± 324 ^b
ZGT9	127,6 ± 1,4 ^b	459,0 ± 36,5 ^b	3597 ± 40 ^b

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3).

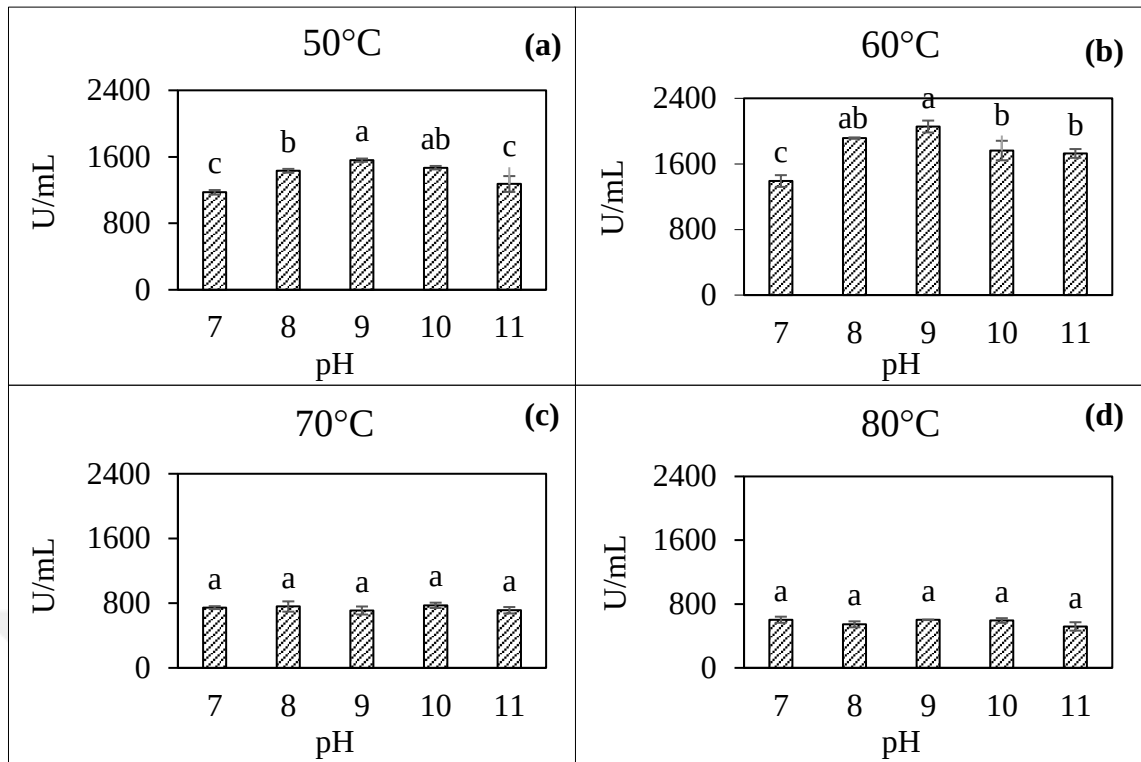
Gençkal ve Tari (2006) tarafından yürütülen bir araştırmada 85 farklı *Bacillus* izolatının ham proteaz üretim koşulları incelenmiştir. Kazeinin substrat olarak kullanıldığı araştırmada proteolitik aktivite en yüksek 222 U/mL olarak belirlenmiş,

ham proteaz üretimi için bakterinin optimum gelişme koşulları 37 °C, 180 dev/dk, %5 inokulum oranı ve 95 saat olarak bildirilmiştir. Diğer bir araştırmada *Bacillus* cinsi bakterinin 5 gün inkübe edilmesiyle üretilen ham proteazın aktivitesi belirlenmiş, substrat olarak azokazein kullanılmıştır (10 g/L). Tepkime pH 9 ve 60 °C’de gerçekleştirilmiş (15 dk) ve proteaz aktivitesi 1620 U/mL olarak rapor edilmiştir (Lermen ve ark, 2022).

Bakteriyel proteaz üretiminde sıcaklık, pH, inokulum miktarı, inkübasyon süresi ve besiyeri içeriği gibi mikroorganizma gelişimine doğrudan etki eden faktörlerin proteaz üretimi üzerinde de etkili olduğu bilinmekte, koşullar optimize edilerek proteaz aktivitesi iyileştirilebilmektedir (Avcı ve ark, 2021). Bu çalışmada *Bacillus* sp. EBTA7, gösterdiği yüksek proteolitik aktivite sebebiyle ham proteaz üretiminde kullanılacak izolat olarak seçilmiştir.

3.7.5.3. *Bacillus* sp. EBTA7 proteazının optimum pH ve sıcaklığı

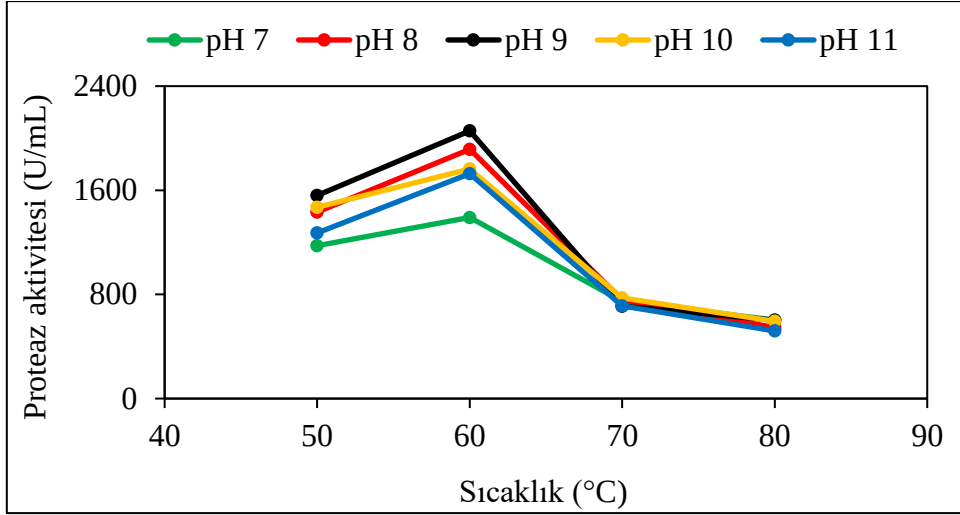
Bacillus sp. EBTA7 tarafından üretilen ham proteazın değişen sıcaklık (50-80 °C) ve pH (7-11) değerlerindeki tepkime sonunda elde edilen proteaz aktivitesi bulguları Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8. *Bacillus* sp. EBTA7 tarafından üretilen ham proteazın farklı pH ve sıcaklıkta elde edilen proteaz aktivitesi değerleri. a) 50 °C b) 60 °C c) 70 °C d) 80 °C.

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).

Proteaz aktivitesi 50 °C’de 1173-1560 U/mL, 60 °C’de 1391-2056 U/mL, 70 °C’de 709-773 U/mL ve 80 °C’de 519-603 U/mL aralığında belirlenmiştir. Sıcaklık 60 °C’deyken proteaz aktivitesi tüm pH değerlerinde en yüksek belirlenmiş ve sırasıyla 50 °C, 70 °C ve 80 °C için aktivitede düşüş gözlenmiştir. pH’ın aktivite üzerindeki etkisi incelendiğinde, 50 ve 60 °C için pH 7-9 arası artma, 9-11 arası azalma eğilimi göstermiş ve iki sıcaklık değeri için de en yüksek aktivite pH 9’da elde edilmiştir. 70 ve 80 °C için pH’daki değişim aktivite üzerinde anlamlı bir etki yaratmazken ($p > 0,05$), tüm aktivite değerlerinin orta düzeyde olduğu görülmüştür. Özetle, ham enziminin proteolitik aktivitesi çalışılan tüm pH değerlerinde (7-11) genel olarak yüksek olup, bu durum enzimin alkali özellikte olduğuna işaret etmektedir (Rao ve ark, 1998). Sonuç olarak, *Bacillus* sp. EBTA7 ham enzimi için en yüksek proteaz aktivitesi değerine (2056 U/mL) 60 °C ve pH 9’da ulaşılmış ve bu koşullar optimum olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9).

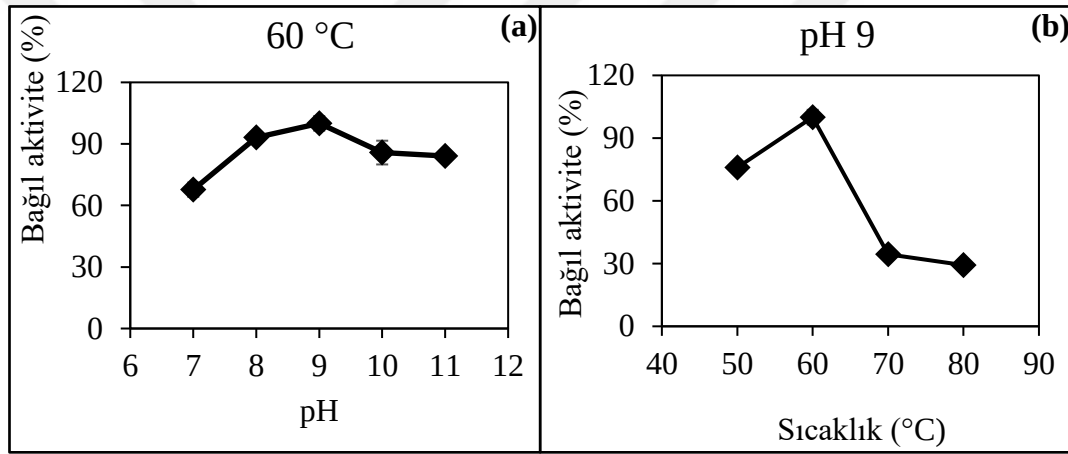


Şekil 3.9. *Bacillus* sp. EBTA7 tarafından üretilen ham enzimin proteaz aktivitesinin pH ve sıcaklığa bağlı değişim grafiği.

Bacillus sp. tarafından ticari kullanıma yönelik üretilen alkali proteazlar genel olarak pH 8-12 aralığında en yüksek aktiviteye sahiptir (Rao ve ark, 1998). Bu çalışmaya benzer şekilde *Bacillus* sp. CL14 (1620 U/mL) (Lermen ve ark, 2022), *Aeromonas veronii* OB3 (Manni ve ark, 2020), *Bacillus amyloliquefaciens* MA20 (922 U/mL) ve *Bacillus subtilis* MA21 (814 U/mL) (Hassan ve ark, 2013) tarafından elde edilen ham proteazın aktivitesi pH 9 ve 60 °C için en yüksek tespit edilmiştir. Asim ve ark. (2022) *Bacillus subtilis* NCIMB-10144 kaynaklı saflaştırılmış proteazın pH 9’da aktivitesinin %97 ve pH 11’de %50 oranında korunduğunu bildirmiştir. Ramalingam ve ark. (2022) *B. subtilis* VBC7 kaynaklı alkali proteaza kısmi saflaştırma işlemi uyguladıktan sonra enzimin aktivite koşullarını belirlemiştir. Buna göre enzim pH 5-12 aralığında aktivite göstermiş, en yüksek aktivite pH 10’da (%100), en düşük aktivite ise pH 4’te (%45) elde edilmiştir. Aynı çalışmada enzimin 40 °C’de en yüksek (%100) olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında (10-70 °C) aktivite sergilediği ve aktivitenin 80 °C’ye kadar devam ettiği bildirilmiştir (%30). Bir diğer çalışmada, *Bacillus licheniformis* tarafından elde edilen ham proteaz için 30-80 °C aralığında enzim aktivitesi belirlenmiş, aktivitenin 60 °C’ye kadar arttığı ve sonrasında azaldığı bildirilmiştir. Aynı enzim pH 6-12 arasında en yüksek pH 8’de aktivite göstermiştir (Espoui ve ark, 2022).

Proteaz aktivitesi ayrıca bağıl aktivite olarak ifade edilmiştir. Bunun için farklı koşullarda elde edilen proteaz aktivitesi değerleri, en yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü değere oranlanmıştır (Lucena ve ark, 2020). Buna göre bağıl aktivite 60 °C ve pH 9 için %100 kabul edilmiştir. Aynı sıcaklıkta pH 8 için bağıl aktivite çok az

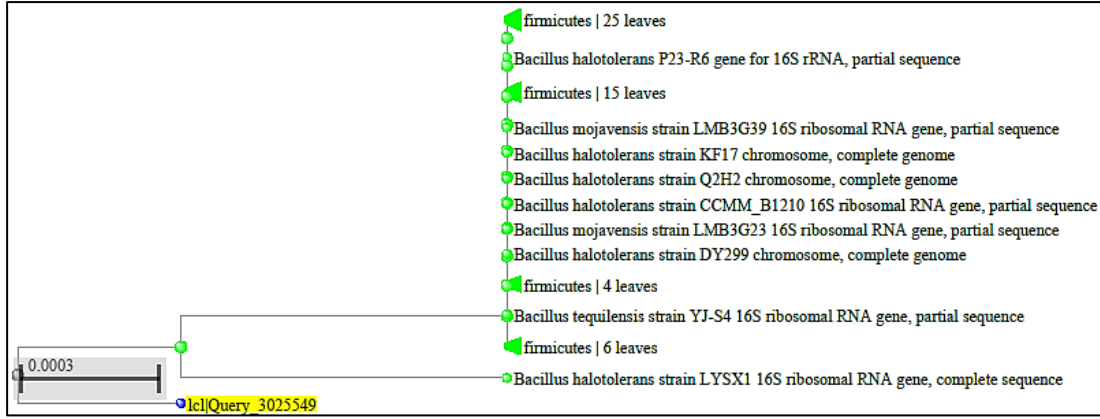
azalarak %93'e düşmüştür (Şekil 3.10a). pH 9'da sıcaklık 60 °C'nin üzerine çıktıkça bağıl aktivite temel inaktivasyon sonucu önemli ölçüde azalmış ve 70 ve 80 °C için sırasıyla %35 ve %29'a gerilemiştir (Şekil 3.10b). Avcı ve ark. (2021), *Bacillus* sp. EBTA6 tarafından elde edilen ham proteaz için 23-90 °C aralığındaki en yüksek aktivitenin 50 ve 60 °C'de görüldüğünü bildirmiştir. Çalışılan pH 4-10 aralığında en yüksek aktivite pH 8 ve 9'da belirlenmiş ve bu değerler için bağıl aktivitenin sırasıyla %100 ve %89 olduğu rapor edilmiştir. Genel olarak literatürde bildirilen çalışmalar *Bacillus* proteazlarının büyük kısmının 50-60 °C arasında yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Tüm bu bilgilerin ışığında *Bacillus* sp. EBTA7 ekstraselüler ham proteazın özellikleri alkali ve ılımlı termofilik olarak belirlenmiş olup elde edilen bulgular literatür ile uyum göstermektedir (Bertoldo ve Antranikian, 2002).



Şekil 3.10. Proteaz bağıl aktivitesinin farklı tepkime koşullarında değişim grafiği a) pH, b) Sıcaklık.

3.7.5.4. *Bacillus* sp. EBTA7 izolatının tanımlanması

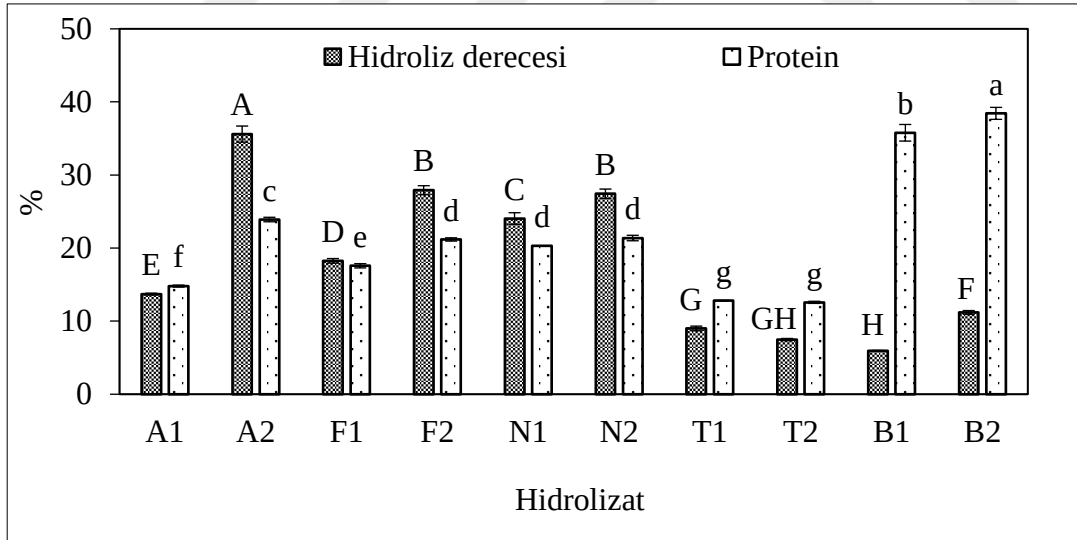
Bacillus sp. EBTA7 izolatı Gram pozitif ve katalaz pozitif olup spor oluşturma özelliğindedir. İzolat 16S rDNA dizi analizi sonucunda *Bacillus mojavensis* ile %99,86 oranında benzerlik göstermiştir. İzolata ait filogenetik ağaç Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. *Bacillus* sp. EBT A7 bakterisine ait 16S rDNA gen dizi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.

3.7.6. Direkt hidrolizle elde edilen siyez hidrolizatlarının protein içeriği ve hidroliz derecesi

Proteolitik hidroliz, peptit bağlarını parçalarken daha kısa peptitler veya serbest amino asitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu süreç, hidrolizatların veya peptitlerin amino asit bileşimini, moleküler ağırlığını ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir (Sotoudeh ve Azizi, 2024). Siyez unu hidrolizatlarının (SUH) ham protein içeriği ve hidroliz derecesi (HD) Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.12. Farklı proteazlar kullanılarak iki farklı enzim/substrat oranında elde edilen siyez unu hidrolizatlarının hidroliz derecesi ve protein içeriği.

*Aynı seride farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$). (Ham protein içeriği kuru madde bazında verilmiş ve N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

Siyez unu hidrolizatlarının hidroliz derecesi %6,0 ile %35,6 aralığında; protein içeriği (KM’de) %12,6-38,4 arasında tespit edilmiştir. Bununla birlikte, siyez

hidrolizatlarının protein içeriği ve HD arasında doğrudan bir ilişki tespit edilmemiştir. Örneğin, B hidrolizatları nispeten düşük HD değerlerine sahipken (%6,0; %11,2), protein içeriği (%35,8; %38,4) en yüksektir. Bununla birlikte, enzim miktarının HD üzerinde önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Örneğin, %1 Alcalase ile en yüksek HD'ye ulaşılırken (%35,6), %0,25 Alcalase tarafından HD anlamlı ölçüde düşük elde edilmiştir (%13,7). E/S oranının %0,25'ten %1'e (h/a) yükseltilmesi, Tripsin hariç tüm ticari proteaz türevi hidrolizatlar için HD'yi anlamlı ölçüde artırmıştır. Benzer şekilde, ham enzim konsantrasyonunun %50'den %100'e (h/a) çıkarılması, *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7'den elde edilen hidrolizatlar için HD'yi önemli ölçüde iyileştirmiştir.

Sharma ve ark. (2023) Alcalase ile elde edilen mısır hidrolizatı için %33,76'lık bir HD bildirilmiş olup bu değer bizim bulgularımızla uyumludur. Benzer şekilde, Alcalase hidrolizatları, Jin ve ark. (2016) ve Karimi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalarda Flavourzyme hidrolizatlarına kıyasla nispeten daha yüksek HD göstermiştir. HD'nin enzim türü, E/S oranı, sıcaklık, pH ve reaksiyon süresi dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (Gu ve ark, 2024).

3.7.7. Siyez hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi

3.7.7.1. Serbest radikalini giderim aktivitesi

Siyez protein hidrolizatlarının DPPH radikalini giderim aktivitesi μmol Troloks eş değeri ($\mu\text{mol TE/g}$) hidrolizat cinsinden belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.12'de verilmiştir. Hidrolizatların DPPH giderimi 17,7 ile 33,0 $\mu\text{mol TE/g}$ hidrolizat arasındadır. A2 ve F2 hidrolizatları önemli ölçüde yüksek DPPH aktivitesi sergilemiş olup ikisi için de aktivite değeri 33,0 $\mu\text{mol TE/g}$ 'dır. E/S oranındaki artış, çoğu hidrolizatın DPPH aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuş, özellikle A, F ve B hidrolizatlarının aktivitesini artırmıştır. Buna karşın, E/S oranı ile N hidrolizatının aktivitesi arasında ters korelasyon gözlenmiştir. Akbari ve ark. (2023) mısır kepeğinin DPPH giderim aktivitesinin proteolitik hidroliz ile iyileştiğini ve bunun antioksidan peptit salınımıyla ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Genel olarak, siyez hidrolizatlarının DPPH giderimi yüksek olup, fisin (14,46 $\mu\text{mol TE/g}$) (Seyedain-Ardabili ve ark, 2023) ve *W. coagulans*'ın enzimatik ekstraktı (65,85 $\mu\text{mol TE/g}$) (Sotoudeh ve Azizi, 2024) ile elde edilen buğday gluteni hidrolizatlarının aktivitesi ile benzer düzeydedir.

Tablo 3.12. Siyez hidrolizatlarının DPPH ve ABTS radikallerini giderim aktivitesi.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
DPPH										
(μmol	17,7 $\pm$	33,0 $\pm$	22,2 $\pm$	33,0 $\pm$	23,1 $\pm$	18,6 $\pm$	20,2 $\pm$	18,3 $\pm$	18,5 $\pm$	22,1 $\pm$
TE/g	1,0 ^E	0,7 ^A	0,5 ^{BC}	0,7 ^A	1,0 ^B	1,1 ^{DE}	0,8 ^{CD}	0,2 ^{DE}	0,4 ^{DE}	0,1 ^{BC}
KM)										
ABTS										
(μmol	111 $\pm$	183 $\pm$	152 $\pm$	184 $\pm$	155 $\pm$	161 $\pm$	108 $\pm$	107 $\pm$	190 $\pm$	189 $\pm$
TE/g	2 ^D	1 ^A	1 ^C	1 ^A	2 ^{BC}	6 ^B	3 ^D	2 ^D	3 ^A	3 ^A
KM)										

*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$). * Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: 1/2; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1.

Bir hidrolizatın antioksidan potansiyelini değerlendirirken, öncü proteinin doğasını (bitkisel veya hayvansal), kullanılan enzimlerin özelliklerini (endo veya ekzoproteaz) ve hidroliz derecesini dikkate alarak birden fazla antioksidan aktivite analizi uygulamak kritiktir (Nuutila ve ark, 2003; Polanco-Lugo ve ark, 2014; Sbroggio ve ark, 2016). Bu bağlamda, SUH'un ABTS radikalini giderim aktivitesi $\mu\text{mol TE/g}$ hidrolizat cinsinden belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.12'de verilmiştir. Hidrolizatların ABTS giderimi 107 ile 190 $\mu\text{mol TE/g}$ hidrolizat arasında belirlenmiştir. B1 hidrolizatı 190 $\mu\text{mol TE/g}$ değeriyle en yüksek aktiviteye sahip olup bu değeri dört hidrolizatın arasında anlamlı bir fark olmaksızın B2, F2, ve A2 hidrolizatları takip etmektedir (183-189 $\mu\text{mol/g}$). Artan enzim konsantrasyonunun ABTS giderim aktivitesi üzerindeki etkisi A ve F hidrolizatları için daha belirginken, N, T ve B hidrolizatları için farklı E/S oranında uygulama sonucu aktivitede anlamlı bir değişime rastlanmamıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte, SUH'un ABTS radikalini giderim aktivitesinin (107–190 $\mu\text{mol TE/g}$) DPPH gideriminden (17,7–33,0 $\mu\text{mol TE/g}$) belirgin şekilde daha yüksek olması dikkat çekmektedir. ABTS giderim aktivitesindeki bu fark, suda çözünür ABTS radikalinin sönmülmesini sağlayan polar amino asitlerin hidrolizle birlikte daha fazla salınmış olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Phongthai ve ark, 2018). Bu eğilim, buğday kepeği (Li ve ark, 2023) ve buğday gluteni hidrolizatları (Seyedain-Ardabili ve ark, 2023; Khosravi ve ark, 2022) için bildirilen bulgulara benzerdir.

ABTS giderimi çok yönlü bir yaklaşıma sahip olan bir yöntem olup, polar (suda çözünür) ve polar olmayan (organik) çözümler dahil olmak üzere çeşitli çözümler ortamlara uyum sağlayarak hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanların antioksidan aktivitesinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Çelik ve ark, 2010). Çalışmada A2 ve F2 hem DPPH hem de ABTS giderimi açısından en yüksek

antioksidan aktiviteyi sergilemiştir. B hidrolizatları da özellikle ABTS gideriminde A2 ve F2 ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (189-189 $\mu\text{mol/g}$) ($p>0,05$). ABTS gideriminin aksine, on örnek arasında B hidrolizatlarının DPPH giderim aktivitesi nispeten düşük elde edilmiştir. Bu uyumsuzluk, B hidrolizatlarının kompozisyonuna, bilhassa hidrofobik ve aromatik amino asit içeriğindeki farklılığa atfedilmektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi, proteaz seçimi ve hidroliz derecesi antioksidan aktivite üzerinde doğrudan etkilidir (Daroit ve Brandelli, 2021; Ewert ve ark, 2022). Alcalase ve Flavourzyme proteazlarının %0,25 ve %1 (h/h) oranında uygulanması, A ve F hidrolizatları için hidroliz derecesini anlamlı düzeyde artırmış, artan hidroliz derecesi DPPH ve ABTS giderimi açısından bu hidrolizatların antioksidan özelliklerinin gelişmesi üzerinde doğrudan etki yaratmıştır. Bu bulgu, hidrolizatların antioksidan potansiyelinin modifiye edilmesinde proteaz seçimi ve HD'nin önemine vurgu yapmaktadır.

Alcalase, proteinlerdeki peptit bağlarını kıran bir serin endopeptidazdır ve bir amino asidin karboksil grubu ile bir sonraki amino asidin amin grubu arasındaki amid bağını kırmaktadır. Hidrofobik amino asit kalıntılarının yakınında bulunan peptit bağlarını hidroliz etme eğiliminde olması sebebiyle karboksil ucunda polar olmayan amino asit kalıntıları içeren peptitler açığa çıkarmaktadır (Meinlschmidt ve ark, 2016). Öte yandan Flavourzyme, endopeptidaz ve ekzopeptidaz enzimlerinin kombinasyonu olan ve baskın olarak ekzopeptidaz aktivitesi gösteren bir proteazdır. N ucundaki peptit bağlarını kırarak kısa zincirli peptit veya amino asitleri serbest bırakmaktadır (Bruno ve ark, 2019). A ve F hidrolizatlarında gözlemlenen HD artışı, muhtemelen daha hidrofobik peptitlerin oluşumuyla sonuçlanmıştır. Hidrofobik peptit varlığındaki artışın antioksidan aktiviteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Çalışma bulguları Alcalase (Bazsefidpar ve ark, 2024; Gu ve ark, 2024) ve Flavourzyme (Kamran ve ark, 2023) enzimlerinin ABTS'ye karşı güçlü bir süpürücü etki göstermeleri sebebiyle tahıl proteinlerinden antioksidan bileşiklerin üretimi için uygun enzimler olduğunu bildiren araştırmalarla uyumludur.

3.7.7.2. Demir şelatlama

Demir II (Fe^{+2}) ve bakır II (Cu^{+2}) iyonları biyolojik süreçler için gerekli geçiş metallere (Gulcin ve Alwasel, 2022). Bu iyonlar Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri gibi hücre içi tepkimeler yoluyla elektron alıp verebildikleri için reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu güçlü bir şekilde desteklerler (Hancock, 1992). Bu

sebeple geçiş metallerinin birikimi ROT birikimine katkıda bulunarak, biyomoleküler hasara bağlı olarak insan vücutunda ciddi sorunlara yol açmaktadır (El Hajj ve ark, 2023). Protein hidrolizatları ve peptitler, metal iyonlarına bağlanması yönünden elverişli maddeler olarak bilinmektedir (Chen ve ark, 2022). Siyez unu hidrolizatlarının demir iyonu şelatlama aktivitesi mg EDTA eş değeri/g hidrolizat cinsinden belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.13'te verilmiştir. Buna göre şelatlama aktivitesi 0,09 ile 3,08 mg EDTA/g hidrolizat arasında tespit edilmiştir. B hidrolizatları, aralarında önemli bir fark olmaksızın en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Artan E/S oranı A ve F hidrolizatları için şelatlama aktivitesini artırırken, N ve T hidrolizatları için azalmaya neden olmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3.13. Siyez hidrolizatlarının demir şelatlama aktivitesi.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
Demir şelatla ma (mg EDTA/ g KM)	0,36 ± 0,01 ^F	0,82 ± 0,01 ^C	0,75 ± 0,04 ^C	1,09 ± 0,02 ^B	0,63 ± 0,03 ^D	0,57 ± 0,04 ^E	0,25 ± 0,02 ^G	0,09 ± 0,01 ^H	3,08 ± 0,01 ^A	3,07 ± 0,00 ^A

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$). * Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: ½; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1.

Aydemir ve ark. (2022), kuru fasulye hidrolizatlarının 27,9 mg EDTA/g demir şelatlama aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada, en yüksek aktivite değeri literatürde bildirilen değerlerden önemli ölçüde düşüktür. Bu nedenle, B hidrolizatları için yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) (mg/mL), demir iyonlarının %50'sini şelatlayan örnek miktarını temsil etmek üzere belirlenmiştir. IC₅₀ değerinin hesaplanmasında, hidrolizatların değişen konsantrasyonuna (0,01-4 mg/mL) karşı şelatlama aktivitesi grafiğindeki eğri denkleminde yararlanılmıştır (veri verilmedi). Buna göre B1 ve B2'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,46 ve 0,47 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bulgular B hidrolizatları için şelatlama aktivitesinin bildirilen çalışmalara paralel şekilde yüksek olduğunu göstermiştir. Örneğin, Alcalase kullanılarak üretilen buğday unu hidrolizatı (Gazikalović ve ark, 2022) ve fisin ile üretilen buğday gluten proteini hidrolizatının (Seyedain-Ardabili ve ark, 2023) IC₅₀ değeri sırasıyla 1,83 ve 6,07 mg/mL olarak bildirilmiştir. Karami ve ark. (2022), Alcalase ile üretilen adzuki fasulyesi protein hidrolizatının 0,30 mg/mL (IC₅₀) metal şelatlama aktivitesine sahip olduğunu rapor etmiştir.

Araştırmalar, demir iyonlarının uzun zincirli peptitler tarafından yakalanma olasılığının daha yüksek olduğu öne sürmektedir. Bu görüş, biracılık artışı tahıllardan elde edilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi ile şelat oluşturma aktivitesi arasında belirlenen negatif korelasyon ile desteklenmektedir (Abeynayake ve ark, 2022). O halde, B hidrolizatları için daha uzun zincir uzunluğuna sahip, diğer bir ifade ile daha büyük molekül ağırlığındaki peptitlerin serbest kaldığı düşünülmektedir. Buna karşın, T hidrolizatları görece düşük HD'lerine rağmen (%7,5-9,0) tüm hidrolizat içerisinde en az demir iyonu şelatlama aktivitesine sahiptir (0,09-0,25 mg EDTA/g) ($p<0,05$). Bulgulardaki bu farklılığın enzim türünden kaynaklanabileceği, farklı proteazların proteinleri farklı bölgelerden açması sonucu oluşan peptit amino asit dizisindeki farklılıklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

3.7.7.3. Toplam fenolik madde

Siyez unu hidrolizatlarının toplam fenolik madde (TFM) miktarı mg gallik asit eş değeri (mg GAE)/g hidrolizat cinsinden ifade edilmiş ve sonuçlar Tablo 3.14'te verilmiştir. Hidrolizatların TFM miktarı 6,94 ile 14,98 mg GAE/g arasında değişmektedir. En yüksek TFM içeriği F2 için elde edilmiş, bunu 13,03 mg GAE/g ile A2 takip etmiştir ($p>0,05$). E/S oranının artması sonuncu A ve F hidrolizatlarının TFM içeriği önemli düzeyde artmış ($p<0,05$), bu bulgu DPPH ve ABTS serbest radikallerinin giderim aktivitesinde gözlenen artış eğilimini desteklemiştir. Ayrıca, T hidrolizatlarının TFM içeriği serbest radikal giderimi ve demir şelatlama bulgularıyla paralellik göstermiş ve diğer hidrolizatlara kıyasla genel olarak önemli düzeyde düşük (6,94-7,70 mg GAE/g) tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 3.14. Siyez hidrolizatlarının toplam fenolik madde içeriği.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
Toplam fenolik madde (mg GAE/g KM)	7,62 ± 0,32 ^F	13,03 ± 0,33 ^B	9,57 ± 0,45 ^E	14,98 ± 0,68 ^A	10,49 ± 0,39 ^{DE}	10,28 ± 0,40 ^{DE}	7,70 ± 0,37 ^F	6,94 ± 0,06 ^F	11,00 ± 0,29 ^{CD}	11,65 ± 0,03 ^C

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$). * Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: 1/2; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1.

Fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan, en az bir hidroksil grubu içeren aromatik halkaya sahip kimyasal bileşiklerdir. Redoks potansiyeline sahip olmaları nedeniyle antioksidanlar gibi davranma eğilimindedirler (Ayad ve Akkal, 2019; Johari ve

Khong, 2019). Enzimatik hidrolizle protein-polifenol komplekslerinin parçalanması sonucu peptit fraksiyonlarında bulunan polifenoller serbest kalmakta ve böylece hidrolizatın TFM içeriği artmaktadır (Sarker ve ark, 2020). Liu ve ark. (2017) *Bacillus subtilis*'in fermentasyonu ile elde edilen yağsız buğday tohumu hidrolizatı için TFM içeriğini bu çalışmaya kıyasla biraz daha yüksek elde etmiştir (26,09 mg GAE/g). Diğer araştırmacılar pirinç kepeği hidrolizatı (Supawong ve ark, 2019) ve kırmızı barbunya fasulyesi hidrolizatı (Sarker ve ark, 2020) için TFM içeriğini sırasıyla 29 ve 44,8 mg GAE/g olarak bildirmiştir. Flavourzyme enziminde çoğunlukla ekzopeptidazlar görev alarak peptit zincirinin ucundan bir amino asit ayırmakta ve serbest amino asitlerin salınımını gerçekleştirmektedir (Qu ve ark, 2023). Çalışmada en çok TFM içeriğine Flavourzyme uygulaması sonucunda (F2) ulaşılmış, böylece hidroliz ile fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aromatik amino asitlerin salınımının daha fazla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

3.7.8. Teknolojik özellikler

3.7.8.1. Emülsifiye edici özellikler

Siyez unu hidrolizatlarının emülsifiye edici özellikleri emülsiyon aktivite indeksi (EAI, m²/g) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.15'te verilmiştir. Buna göre hidrolizatların EAI değerleri 28 (F1) ile 61 m²/g (T2) arasındadır. E/S oranındaki artış N, T ve B hidrolizatlarının EAI değerlerinde anlamlı bir fark yaratmazken, A ve F üzerinde önemli ölçüde etkili olmuştur. A hidrolizatı için EAI 52'den (A1) 31 m²/g'a (A2) düşmüş, F için 28'den (F1) 39 m²/g'a (F2) yükselmiştir. A2'nin en yüksek hidroliz derecesindeki (%35,6) hidrolizat olduğu göz önünde bulundurulduğunda, A için EAI değerindeki bu düşüşün proteinlerin aşırı düzeyde hidroliziyle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 3.15. Siyez hidrolizatlarının emülsiyon aktivite ve emülsiyon stabilite indeksi.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
EAI _(0, dk)	52 ± 2 B	31 ± 2 DE	28 ± 1 E	39 ± 2 C	37 ± 1 C	39 ± 0 C	58 ± 2 A	61 ± 1 A	35 ± 1 CD	32 ± 0 D
EAI _(10, dk)	5 ± 0 F	15 ± 1 D	8 ± 1 E	3 ± 0 F	3 ± 0 F	4 ± 0 ^F	20 ± 1 C	22 ± 2 C	33 ± 0 A	29 ± 0 B
ESI	11 ± 0 C	19 ± 0 C	13 ± 0 C	11 ± 0 C	11 ± 1 C	11 ± 0 C	15 ± 0 C	16 ± 1 C	227 ± 59 ^A	105 ± 6 ^B

*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). * Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: 1/2; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1. EAI: Emülsiyon aktivite indeksi (m²/g); ESI: Emülsiyon stabilite indeksi (dk).

Protein zincirlerinin proteazlar tarafından açılması, kısa zincirli peptit sayısının artmasıyla sonuçlanmaktadır. Yağ damlacıklarını çevreleyen kısa peptitler, su ve yağ arasında daha az kararlı yapıda bir tabaka oluşturarak arayüz geriliminin artmasına ve dolayısıyla zayıf bir emülsiyon gücüne yol açar (Niazi ve Torabizadeh, 2022). Bu sebeple, istenilen seviyede emülsiyon aktivitesine ulaşmak için hafif düzeyde hidroliz önerilebilir. Bozkurt ve ark. (2021), hafif seviyede hidroliz ile (HD: %3,1-25,6) üretilen glütenin hidrolizatlarının EAİ değerini 15,1-42,9 m²/g arasında bildirmiştir.

Hidrolizatların ESİ değeri 11-227 dk arasında tespit edilmiştir. B hidrolizatları genel olarak en yüksek ESİ'ye sahipken, E/S oranındaki artış stabiliteyi olumsuz etkilemiştir (B1: 227 dk, B2: 105 dk). B hariç tüm hidrolizatlar oldukça düşük (11-19 dk) stabilite göstermiştir (p>0,05). Benzer davranış soya proteini (Lopes-da-Silva ve Monteiro, 2019) ve buğday glütenin hidrolizatlarında (Niazi ve Torabizadeh, 2022) da gözlenmiş, HD artışı emülsiyon stabilitesinde azalmaya neden olmuştur. Emülsiyon stabilitesi indeksi, yağ yüzeyinde yeterli düzeyde absorbe olan peptitlerin kararlılığını ifade etmektedir. Peptitler, küçük yağ damlacıklarının komşu damlacıklarla kümelenmesinin önüne geçerek büyük yağ damlacıklarının oluşumunu engellemektedir. Böylece peptitler yağ damlacıklarının boyutunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Gazikalović ve ark, 2022).

3.7.8.2. Yağ tutma kapasitesi

Siyez unu hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi (YTK) g yağ/g hidrolizat olarak belirlenmiş ve YTK bulguları Tablo 3.16'da verilmiştir. YTK 0,70-2,94 g/g arasında olup B2 en yüksek kapasiteye sahip hidrolizattır. Bu değeri B1 takip etmekte olup YTK anlamlı ölçüde düşmüştür 2,78 g/g (p<0,05). B hariç diğer hidrolizatların YTK'si 0,70-1,11 g/g arasında olup B'nin yaklaşık 4'te 1'i seviyesindedir. Deng ve ark. (2016), *Aspergillus usamii* kaynaklı asit proteazla üretilen buğday glütenin hidrolizatı için benzer bulgular elde etmiş, YTK değerini 2,91 g/g olarak bildirmiştir.

Tablo 3.16. Siyez hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
Yağ tutma kapasitesi (g yağ/g hidrolizat)	1,06 ± 0,01 _{CD}	0,78 ± 0,01 _F	0,71 ± 0,02 _F	0,70 ± 0,02 _F	0,95 ± 0,05 _E	0,94 ± 0,04 _E	1,11 ± 0,05 _C	0,99 ± 0,02 _{DE}	2,94 ± 0,05 _A	2,78 ± 0,06 _B

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: 1/2; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1.

Yağ tutma kapasitesi, bir proteinin veya peptidin lipidlerle etkileşime girme yeteneğini gösteren, gıda endüstrisi için önemli bir teknolojik özelliktir. YTK ayrıca, proteinler veya peptitler tarafından fiziksel olarak tutulan yağ miktarı olarak da tanımlanmaktadır (Bozkurt ve ark, 2021). Hidroliz uygulaması, protein yapısı içinde gömülü olan ve yağ ile etkileşime girebilen apolar veya yüklü yan zincirleri serbest bırakarak YTK'nin iyileşmesini sağlamaktadır. Öte yandan, genellikle %10 üzeri HD için kabul gören aşırı hidrolizin esnekliği azalttığı ve iyonik grupların açığa çıkmasını engellediği bildirilmektedir (Bao ve ark, 2017; Villanueva-Lazo ve ark, 2021).

B1 ve B2 hidrolizatları diğer hidrolizatlardan daha düşük hidroliz derecesine (%6,0 ve 11,2) sahip olduğundan, en iyi YTK'nin düşük seviyede HD ile elde edildiği çıkarımı yapılmıştır. Hidroliz derecesi %13,7-35,6 arasında olan A, F ve N hidrolizatlarının yağ absorpsiyon kapasitesi B1 ve B2'den daha düşük elde edilmiştir. Bu sonuçlar, YTK'nin belirli bir HD'ye kadar arttığı ve daha sonra azaldığı olgusuyla uyumludur. Benzer şekilde, Bozkurt ve ark. (2021), Alcalase ile üretilen buğday glütinin hidrolizatlarının nispeten hafif bir hidroliz ile (HD: %3,11) en yüksek YTK değerine ulaştığını bildirmiştir (9,69 g/g). Bu çalışmada ise T hidrolizatları zayıf düzeyde hidroliz olmasına karşın (HD<%10) B hidrolizatları kadar yüksek YTK sergilememiştir. Bu durum kullanılan proteaz türü ve HD'nin YTK'yi önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

3.7.8.3. Köpürme özellikleri

Siyez unu hidrolizatlarının köpürme özellikleri köpük genleşmesi ve köpük stabilitesi açısından % olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.17'de verilmiştir. Buna göre hidrolizatların köpük genleşmesi %27-84 ve köpük stabilitesi %22-94 arasındadır. N1 en iyi köpük genleşmesine sahip olup B1 en kararlı hidrolizattır.

Tablo 3.17. Siyez hidrolizatlarının köpük genleşmesi ve stabilitesi.

	Enzimatik hidrolizatlar									
	A1*	A2**	F1*	F2**	N1*	N2**	T1*	T2**	B1 ¹	B2 ²
Köpük genleşmesi (%)	59 ± 1 C	27 ± 1 E	52 ± 1 D	50 ± 2 D	84 ± 4 A	48 ± 3 D	49 ± 1 D	52 ± 1 D	67 ± 0 B	51 ± 1 D
Köpük stabilitesi (%)	82 ± 5 A	31 ± 4 BC	35 ± 4 BC	22 ± 1 C	36 ± 1 B	26 ± 2 BC	93 ± 12 A	83 ± 2 A	94 ± 2 A	88 ± 2 A

*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). * Enzim/substrat oranı: 0,25/100; ** Enzim/substrat oranı: 1/100; 1 Enzim/substrat oranı: 1/2; 2 Enzim/substrat oranı: 1/1.

Proteinler, sergiledikleri çözünürlük, emülsifiye etme, köpürme ve jel oluşturma gibi temel fonksiyonel özellikleri sebebiyle gıda kalitesini doğrudan etkilemektedir. Gıda proteinlerinin köpürme özellikleri köpük genişmesi ve köpük stabilitesi olmak üzere iki temel parametre tarafından belirlenmektedir. Köpük genişmesi, genel olarak, proteinlerin hava/su arayüzüne hızlı adsorpsiyonu ve burada yeniden düzenlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Protein molekülleri arasındaki etkileşim, esnek bir hava/su arayüzü filmi oluşturarak köpük stabilitesini artırmaktadır. Buna karşılık, köpükler arasındaki etkileşim köpük yapısının bozulması nedeniyle stabiliteyi engellemektedir (Gao ve ark, 2023).

Tüm numunelerde E/S oranındaki artışa bağlı olarak köpük stabilitesinde azalma eğilimi gözlenmiştir. Ancak stabilitedeki azalma sadece, artan enzim miktarından en çok etkilenen ve HD'nin 2,5 katına ulaştığı hidrolizat olan A örneği için önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Bununla birlikte, A, N ve B hidrolizatları için köpük genişmesinde önemli düzeyde düşüş görülmüştür. Bu durumun hidrolizat bileşiminde bulunan diğer makromoleküllerin hava/su arayüz formunu etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin enzimatik uygulamalarla değiştiği bilinmekte ve bu sebeple genellikle konformasyondaki değişime bağlı olarak proteinlerin fizikokimyasal ve işlevsel özelliklerini iyileştirmek için kısmi hidroliz uygulanmaktadır. Ancak hidroliz uygulaması köpürebilirliği artırmasına rağmen köpük stabilitesini artırmamaktadır (Gao ve ark, 2023). Kong ve ark. (2007) tarafından yürütülen araştırma da bu bulguları desteklemektedir. Buğday gluteni ticari proteazlar ile hidroliz edilmiş ve %10 ve %15 HD'ye sahip hidrolizatların köpürme kapasitesi sırasıyla %115 ve %90 olarak bildirilmiştir. En stabil köpük oluşumu ise düşük HD ile (%5) elde edilmiştir.

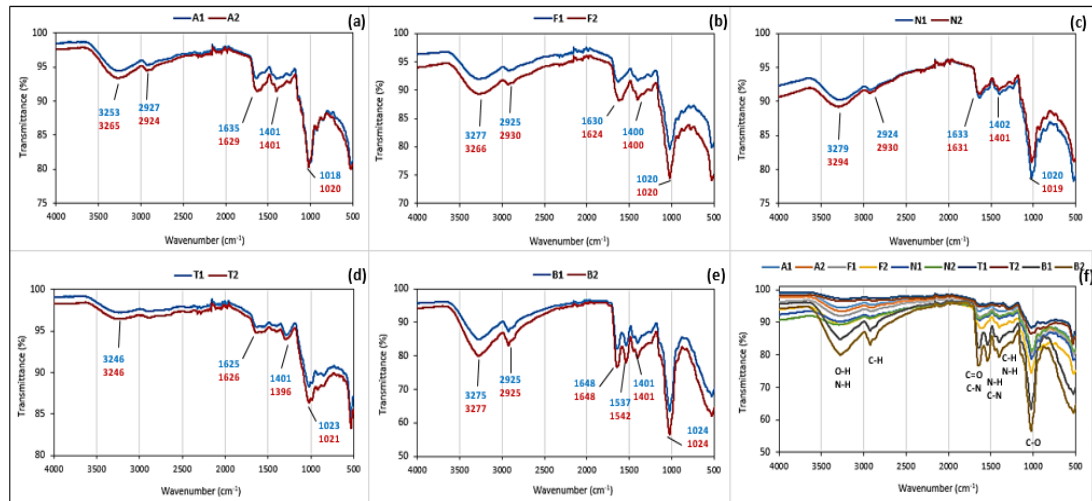
Aşırı hidroliz sonucu elde edilen, düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin hava/su arayüzünde yeniden konumlanmada zorlanmaları ve katlanma yeteneklerinin zayıflaması nedeniyle köpürebilirliğin azaldığı bilinmektedir (Ma ve ark, 2014). Drago ve Gonzalez (2000), fungal proteaz (*Aspergillus oryzae*) ile elde edilen gluten hidrolizatları için moleküler boyut ve esneklik arasındaki dengenin sağlanması yönünden istenilen düzeyde köpürme kapasitesinin elde edilmesi için hafif düzeyde hidroliz işlemi önermiştir (HD: %14). Daha büyük HD değerindeki hidrolizatlarda zayıf seviyede köpürebilirlik gözlenmiş, bu durum polipeptit zincirinin aşırı hidrolizi

sonrası oluşan küçük peptitlerin yüzey aktivitesinde istenmeyen bir etki yaratmış olabileceği yönünde yorumlanmıştır. Peptitler, hava/su ve yağ/su arayüzlerini stabilize etmek için çok küçük ve yetersiz kabul edilmektedir. Bu nedenle, hidrolizatların köpük genleşmesi ve stabilitesinin doğrudan kullanılan enzim türü, hidroliz süresi, HD, oluşan peptitlerin çözünürlüğü ve amino asit bileşimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Chen ve ark, 2011; Ghelich ve ark, 2022).

3.7.9. Fizikokimyasal özellikler

3.7.9.1. FTIR spektroskopisi

Siyez unu hidrolizatlarının fonksiyonel gruplarının kimyasal bağ titreşimini ölçmek amacıyla 4000 ile 500 cm^{-1} frekans aralığında gerçekleştirilen kızılötesi (Ifared: IR) analizine ait spektrum Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Tüm hidrolizatlar için 3500-3000 cm^{-1} frekans aralığında geniş bir bant elde edilmiştir. Bu bant, alkol/fenol gruplarına karşılık gelen O-H'nin gerilme titreşimleri ile moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağlarından kaynaklı N-H grubu gerilmelerine atfedilmiştir (Cui ve ark, 2011; Golea ve ark, 2023). T hidrolizatları hariç tüm örneklerde 2930 cm^{-1} civarında bir absorpsiyon piki gözlenmiş ve bu pik, alkan zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile oluşan alkil gruplarının C-H gerilmesiyle ilişkilendirilmiştir (Coates, 2000; Ouellette, 1998). Tüm örnekler, spektrumun amid I bölgesinde (1700-1600 cm^{-1}) proteinlerin omurga konformasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu bilinen karakteristik bir bant sergilemiştir. Öte yandan, yalnızca B hidrolizatlarında amid II bandı (1480-1590 cm^{-1}) görülmüştür. Tüm örnekler için 1480-1300 cm^{-1} aralığında güçlü bir bant gözlenmiş, bu bant CH ve NH gerilmesi ile CH bükülmesi şeklinde kendini gösteren amid III'ün titreşimlerine atfedilmiştir. Ek olarak, ~1020'deki titreşimler, hidrolizatların parmak izi bölgesi olarak adlandırılabilen C-O gerilmesine atfedilmiştir (Liang ve Marchessault, 1959; Rees, 2010). Bu bulgular Golea ve ark. (2023) tarafından bildirilen buğday unu IR spektrumu ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.13. Siyez hidrolizatlarının FTIR spektrumu.

*a) Alcalase uygulaması (A1: 0,5 E/S oranında, A2: 1/100 E/S oranında); b) Flavourzyme uygulaması (F1: 0,5 E/S oranında, F2: 1/100 E/S oranında); c) Neutrase uygulaması (N1: 0,5 E/S oranında, N2: 1/100 E/S oranında); d) Trypsin uygulaması (T1: 0,5 E/S oranında, T2: 1/100 E/S oranında); e) *B. mojavensis* sp. EBTA7 ham proteazı uygulaması (B1: ½ E/S oranında, B2:1:1 E/S oranında, f) Bütün hidrolizatlar.

Temelde protein yapısındaki peptit bağı bir amid grubudur ve dolayısıyla bir proteinin yapısı, amid bantlarının (amid A, B, I, II ve III) karakteristik IR absorpsiyon pikleri ile tespit edilebilmektedir (Ji ve ark, 2020). Amid I, II ve III bantları protein IR spektrumunda gözlenen birincil bantlardır (Kumar ve ark, 2020). Amid I bandı, ağırlıklı olarak, C=O esneme titreşimleri ile zayıf şekilde C-N fonksiyonel gruplarına ait titreşimlerin karışımından kaynaklanmaktadır (Payne ve Veis, 1988). Amino asit yan zincirleri amid I titreşimlerini etkilememektedir; bu nedenle amid I titreşimleri, proteinlerin α -heliks, β -plaka (tabaka), rastgele bobin ve β -kıvrım (dönüş) gibi ikincil yapısının belirlenmesinde önemlidir (Sahu ve ark, 2023). Amid II bantları, birincil amidlerdeki NH₂'nin deformasyonu sonucu şekillenmekte ve esas olarak N-H düzlem içi bükülme titreşimleri ile ikincil amidlerdeki C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Byrne ve ark, 2020; Kumar ve ark, 2020; Parker, 1971). Amid I bantlarına benzer şekilde, amid II bantları da yan zincirin gerilme titreşimlerinden az etkilenmektedir. Bununla birlikte, amid II frekansı ile ikincil yapı arasında bir ilişki olmadığından, amid II bandı ikincil yapıyı tahmin etmek için uygun olmayıp yalnızca çevresel etkiyi tahmin etmek için uygundur (Oberg ve ark, 2004).

Bu çalışmada B örneklerinde görülen amid II bandının, ticari proteazlarla kıyaslandığında proteinleri farklı spesifik kısımlardan bölen *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 ham proteazın özgün yapısından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

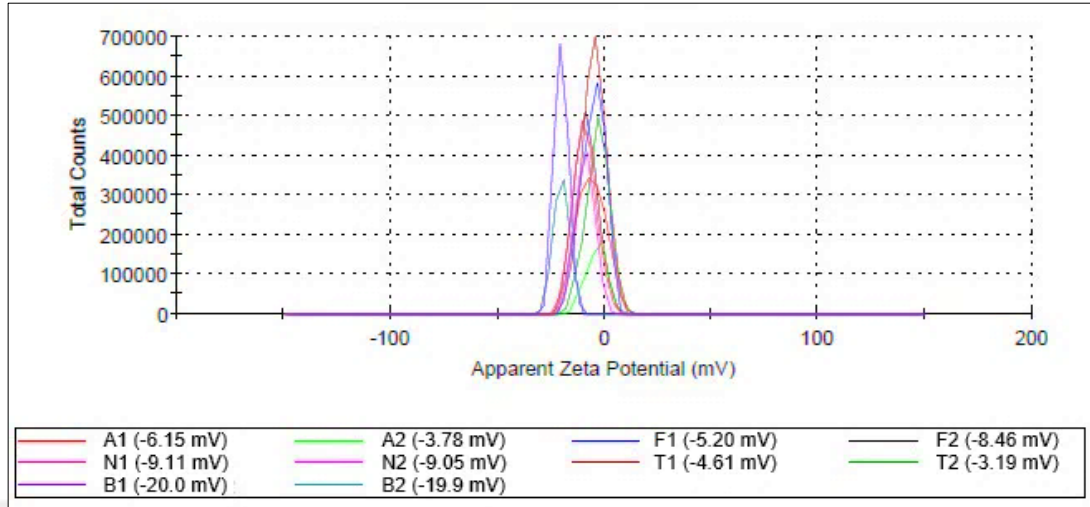
Ayrıca, hidrolizatların ikincil yapısı ağırlıklı olarak β -plaka olarak belirlenmiş (A, F, N ve T hidrolizatları için), bununla birlikte B hidrolizatları için α -heliks yapısı gözlenmiştir (Sahu ve ark, 2023). Bu sonuçlar Cian ve ark. (2015) tarafından bildirilen buğday glütenu peptit spektrumu ile uyum göstermektedir. Bu çalışma, iki farklı E/S oranında uygulanan her bir enzimatik hidrolizin, tüm hidrolizatlarda farklı bant konumlanmalarına yol açtığını göstermiştir. Bantlar genel olarak enzim miktarındaki artıştan sonra düşerek kırmızı çizgiye kaymıştır (Şekil 3.13). Ancak enzim miktarındaki değişim bantların yoğunluğunu etkilememiştir. Elde edilen sonuçlar diğer çalışmalar ile uyumlu olup, farklı proteazlar ile üretilen hidrolizatların denatürasyon seviyelerine bağlı olarak farklı pik yoğunluğu gösterdiği bulgusunu desteklemektedir (Onsaard ve ark, 2023).

3.7.9.2. Zeta potansiyeli

Kolloidal sistemlerde parçacıklar üzerindeki elektrik yüküne/potansiyeline ilişkin özelliklerin değiştirilmesi veya optimize edilmesiyle istenilen özellikte ürünler üretilmektedir. Potansiyel dağılım, iyonların ve dipolar moleküllerin adsorpsiyonu ile meydana gelmekte ve parçacıkların pıhtılaşması, topaklaşması, çökmesi veya toplanmasına karşı stabilitesinden sorumlu olan parçacıklar arasındaki etkileşim enerjisini belirlemektedir. Zeta potansiyeli, parçacıklar arasındaki elektriksel etkileşimi ortaya koyarak parçacık yüzeyindeki etkin elektrik yükü ölçmekte ve böylece parçacıkların koloidal süspansiyonlardaki fiziksel stabilitesi hakkında fikir vermektedir. -30 mV ile +30 mV arasındaki zeta potansiyeli koloidal sistemin güçlü yapıda olduğuna işaret ederken, daha yüksek zeta potansiyelinin daha iyi emülsiyon ve köpük stabilitesi sağladığı bildirilmektedir. Daha düşük zeta potansiyeli ise sulu ortamdaki parçacıkların zayıf stabiliteye sahip olmasına neden olmaktadır. Zeta potansiyeli sıfır olduğunda katı yüzeyde yüzey yükü bulunmamaktadır (Bozkurt ve ark, 2021; Gazikalović ve ark, 2022; Hunter, 1988; Watson ve Tuzinski, 1989).

Hidrolizatların zeta potansiyeli dağılım grafiği Şekil 3.14'te verilmiştir. Buna göre hidrolizatların zeta potansiyeli dağılımı -20,0 mV ile -3,19 mV arasında belirlenmiştir. Tüm hidrolizatlar, peptidin serbest COO⁻ gruplarına atfedilebilecek negatif yük taşımaktadır. Örneklerin dispers parçacıklarının yüzeyindeki yetersiz yük, suda kararsız yapı oluşumuna işaret etmektedir. B örneklerinde zeta potansiyelinin daha yüksek gözlenmesi ile (B1: -20,0 mV; B2: -19,9 mV), bu hidrolizatların emülsiyon ve

köpük stabilitesi göz önünde bulundurulduğunda, potansiyel dağılım ile üstün fiziksel özellikler arasındaki ilişki doğrulanmaktadır.



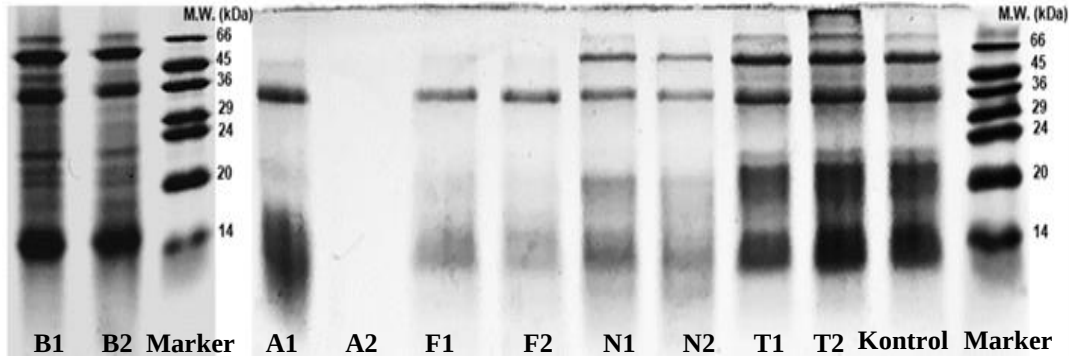
Şekil 3.14. Ticari enzimler ile üretilen hidrolizatların zeta potansiyeli grafiği.

*A1, F1, N1 ve T1 sırasıyla Alcalase, Flavourzyme, Neutrase ve Trypsin ile 0,25/100 E/S oranında; A2, F2, N2 ve T2 ise sırasıyla Alcalase, Flavourzyme, Neutrase ve Trypsin ile 1/100 E/S oranında elde edilen hidrolizatlarıdır. B1 ve B2 sırasıyla *B. mojavensis* sp. EBTA7 ham proteazının ½ ve 1:1 E/S oranında uygulanması sonucu elde edilen hidrolizatlarıdır.

3.7.10. SDS-PAGE ile tanımlama

Siyez unu hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 3.15'te verilmiştir. Peptitlerin moleküler ağırlığı yaklaşık 14 ile 70 kDa arasında belirlenmiştir. Siyez unu kontrol örneği olarak kullanılmış ve enzim uygulaması sonucunda siyez proteinlerine karşılık gelen bazı protein bantlarının kaybolduğu, bununla birlikte yeni bantların varlığı görüntülenmiştir. Özellikle, A2'de hiçbir bant görüntülenmemiş, bu durum yüksek hidroliz derecesinin (%35,6) bir sonucu olarak kısa zincirli ve 14-15 kDa'dan daha küçük molekül ağırlığındaki peptitlerin oluşumuna atfedilmiştir. Böylece, jel görüntüsü siyez proteinlerinin Alcalase ile 1:100 (mL:g) E/S oranındaki aşırı hidrolizini doğrulamıştır. Buna karşılık, F ve N hidrolizatları için 15-35 kDa aralığındaki bantlarda kısmi kayıp meydana gelmiş ve yaklaşık 20 kDa'da soluk/zayıf bant varlığı gözlenmiştir. Bu durum Flavourzyme ve Neutrase tarafından gerçekleştirilen orta düzeydeki hidrolizi doğrulamaktadır. T ve B hidrolizatlarına ait peptit bantlarının kontrol örneği ile oldukça benzer konumda ve yoğunlukta olduğu tespit edilmiş ve bu durum tripsin ve *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 uygulamasının daha düşük hidroliz dereceleriyle sonuçlanmış olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, ham proteaz uygulaması sonucu B hidrolizatlarında 15-23 kDa aralığında yeni

bantların ortaya çıkması, siyez proteinlerinin farklı zincir uzunluklarına sahip peptitlere parçalandığını göstermiş ve böylece enzim seçiminin önemini yansıtmıştır.



Şekil 3.15. Siyez hidrolizatlarının SDS-PAGE profili.

Hidrolizatların SDS-PAGE profili genel olarak hidroliz derecesi bulgularıyla örtüşmekte ve ayrıca hidrolizatların çeşitli özellikleri hakkında fikir vermektedir. Örneğin, B1 ve B2'de gözlenen yeni bant oluşumu, B hidrolizatlarının demir iyonu şelatlama ve yağ tutma gibi özelliklerinin diğer örneklerle kıyasla çok daha yüksek belirlenmiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

4. SİYEZ PROTEİNLERİNDEN *BACILLUS MOJAVENSIS* SP. EBTA7 HAM ENZİMİ İLE BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

4.1. Giriş

Bir peptidin biyoaktif özellikleri, peptidin amino asit kompozisyonu ve dizisi, peptit boyut ve ağırlığı, yükü (+/-), hidrofobisitesi ve protein yapısı gibi çeşitli faktöre bağlı değişmektedir. Enzim uygulaması sonucunda proteinlerin molekül ağırlığı azalmakta ve çözünürlükleri artmaktadır. Ayrıca, peptit bağlarının kırılması ile fonksiyonel kalıntıların, serbest amino ve karboksil grupların konsantrasyonu artmakta ve böylece peptitlerin biyolojik özellikleri hidroliz olmamış proteine kıyasla yüksek oranda iyileşmektedir (Daroit ve Brandelli, 2021; Ewert ve ark, 2022).

Peptitlerin istenen biyoaktivite, saflık ve verimlilikte elde edilmesi için çeşitli saflaştırma tekniklerinden yararlanılmaktadır. Ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon, ters fazlı sıvı kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon (boyut dışlama) kromatografisi, afinite kromatografisi, kapiler elektroforez, diyaliz ve diyafiltrasyon uygulamaları ile peptitler moleküler büyüklüklerine, hidrofobik karakterine, yüküne ve bağlanma özelliklerine göre saflaştırılabilmektedir (Cermeño ve ark, 2020; Liu ve ark, 2020; Sridhar ve ark, 2021).

Hidrolizat içeriğindeki peptitlerin moleküler büyüklüğüne göre ayrılması sonucu peptit biyoaktif özelliklerinin iyileştiği bilinmektedir. Kısa zincirli peptitlerin (2-20 amino asit) genellikle daha yüksek işlevsellik gösterdikleri belirlenmiştir (Aluko ve Monu, 2003; Haque ve ark, 2008). Farklı gözenek çapına sahip membranların kullanıldığı filtrasyon uygulamaları ile peptitlerin moleküler ağırlığına göre ayrımı sağlanmakta ve böylece istenilen özellikte peptitler elde edilebilmektedir. Araştırmacılar, ultrafiltrasyon uygulaması sonucunda elde edilen küçük MA'lı peptitlerin (< 5 kDa) antioksidan özelliklerinin daha yüksek olduğunu bildirmektedir (Kumar ve ark, 2023). Benzer şekilde, kısa zincirli peptitlerin (< 1 kDa) α -amilaz inhibitör aktivitesinin çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hao ve ark, 2024).

Tez çalışmasının bu kısmında, proteaz üretim yeteneği yüksek olduğu belirlenen *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 suşu ile ham proteaz üretilmiş ve siyez proteinlerinin enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Protein hidrolizatı ultrafiltrasyon sistemi ile MA peptit fraksiyonlarına ayrılmış ve fraksiyonların bazı biyoaktif ve teknolojik özellikleri incelenmiş, fizikokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Çalışmanın bu kısmı Alberta Üniversitesi (Kanada) Bitkisel Protein ve Teknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

4.2. Materyal ve Yöntem

FerroZine (4,4'-[3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazine-5,6-diyl]bis-benzenesulfonic acid, monosodium salt, hydrate) ACROS Organics (Geel, Belçika); ANS (8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid) Sigma-Aldrich (Louis, ABD); demir(II) klorür (Cl_2Fe), sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium phosphate monobasic monohydrate, gallik asit, ammonium sulfate, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Folin & Ciocalteu's fenol reaktifi (FCR), demir(III) klorür, sodyum karbonat, patates nişastası, sodium klorür ve pyrogallol Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya); potassium ferricyanide, L-ascorbic acid ve Corning şişe üstü vakumlu steril membran filtre (0,22 μm) Fisher Chemical (New Jersey, ABD); acarbose Alfa Aesar (Ottawa, Kanada), 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Thermo Scientific, Kanada), α -amylase from *Bacillus* sp., liquid (Termamyl 300L) Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya); butyl sepharose 4 fast flow Cytiva (Uppsala, İsveç) ve diyaliz membranı (MWCO: 3,5 kDa, 1 m) Spectra/Por® 7 (ABD) tarafından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 4.1'de listelenmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları, firma ve menşei.

Cihaz	Marka-model
Azot analizatörü	Leco Corporation FP-428 (ABD)
FTIR spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific Inc. Nicolet 6700 (ABD)
Hassas terazi	Denver Instrument Cole-Parmer P-214 (ABD)
Hidrolik pompa	Cole Parmer Instrument, Masterflex Easy Load II (ABD)
Homojenizatör	IKA T18 digital ULTRA TURRAX (Almanya)
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 12 L (ABD)
Manyetik karıştırıcı	Corning PC-420D (ABD)
Membran kaset sistemi	Pall Life Sciences T-Series TFF kaset Omega™ membran (ABD)
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices SpectraMax M3 (ABD)
Nem analizatörü	Mettler Toledo MJ33 (ABD)
pH-metre	Mettler Toledo SevenCompact (ABD)
Santrifüj	Beckman Coulter Avanti J-E (ABD)
Su banyosu	Thermo Scientific Precision 2870 (ABD)
UV-Vis spektrofotometre	DLAB SP-V1000 (Çin)
Zetasizer	Malvern Instruments Ltd. Nano-ZS ZEN 3600 (Birleşik Krallık)

4.2.1. Siyez proteinlerinin ekstraksiyonu

Biyoaktif peptit üretiminde tam tane siyez unu (SU) protein öncülü bitkisel kaynak olarak seçilmiş ve siyez proteinleri hidroliz işleminde substrat olarak kullanılmak üzere ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon Bölüm 3.3.2’de belirtilen yönteme göre ve Bölüm 3.7.4’te belirlenen optimum koşullarda (pH 10 ve %10 katı madde/çözgen oranı) gerçekleştirilmiş, böylece hidroliz işleminde kullanılmak üzere yüksek kapasitede siyez protein izolatu (SPI) elde edilmiştir. İzolatların protein içeriği azot analizatörü ile belirlenmiş ve ardından ekstraksiyon verimi formül 4.1’e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{\text{SPI protein içeriği (100 g undan elde edilen)}}{\text{SU protein içeriği (100 g)}} \times 100 \quad 4.1$$

Toplam protein içeriği Leco azot analizatörü ile belirlenmiştir. Analiz öncesi cihaz önce numune içermezken ve sonra EDTA varlığında azot konsantrasyonu için kalibre edilmiştir. Analiz için yaklaşık 100 mg örnek tartılarak 950 °C’de yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Azot faktörü 5,7 alınarak örneklerin toplam protein içeriği belirlenmiştir (formül 4.2).

$$\% Protein = \% Azot \times 5,7$$

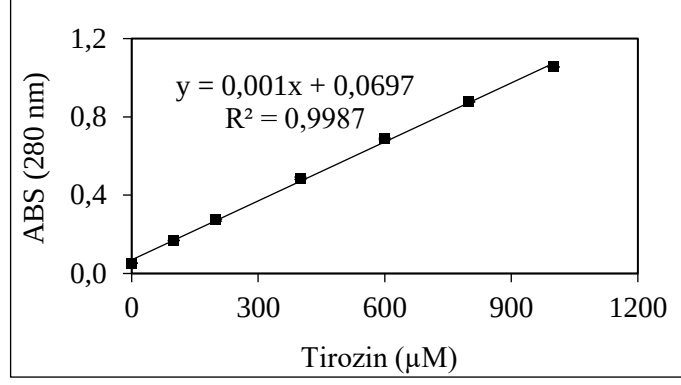
4.2

4.2.2. Proteaz üretimi ve aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmanın ilk kısmında, *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 izolatı sergilediği yüksek proteaz aktivitesi sebebiyle proteaz üretimi için seçilmiştir. İzolatın hücresiz gelişim sıvısı ham proteaz olarak kullanılmış ve sıvı enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Üretilen enzimin proteaz aktivitesi optimum aktivite koşullarında gerçekleştirilen tepkime sonucunda (60 °C ve pH 9) en yüksek 2056 U/mL olarak elde edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında, enzim üretimi Bölüm 3.4.4'te belirtilen yöntemle aynı şekilde fakat yüksek kapasitede gerçekleştirilmiştir. Bu kısımda farklı olarak, enzim üretildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuş ve hidrolizde kullanılmak üzere katı (toz) halde muhafaza edilmiştir (-18 °C).

Katı haldeki enzim hidrolizde kullanılmadan önce, hidroliz işleminin çalışmanın ilk kısmında belirtilen yöntemle benzer şekilde gerçekleştirilmesi için enzimin en yüksek proteaz aktitesi değerine (2056 U/mL) karşılık gelen katı madde miktarının bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla kuru enzim ultra saf suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (10-50 mg/mL). Enzim dilüsyonlarının proteaz aktivitesi Bölüm 3.4.4.1'de belirtildiği şekilde belirlenmiş ve değişen enzim konsantrasyonuna karşı elde edilen proteaz aktivitesi değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Aynı eğriye ait denklem kullanılarak 2056 U/mL aktivite değerine karşılık gelen enzim konsantrasyonu belirlenmiştir. Böylece, hidroliz işlemi öncesinde ham enzim tespit edilen konsantrasyona ulaşılacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır.

Proteaz aktivitesi, Prakasham ve ark. (2006) tarafından bildirilen yöntemle göre ve Bölüm 3.4.4.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi Bölüm 3.7.5.3'te tespit edilen optimum aktivite koşullarında (60 °C ve pH 9) gerçekleştirilmiştir. Aktivitenin belirlenmesinde standart olarak tirozin kullanılmış, bu amaçla tirozin Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 8) çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0-1000 µM). Tirozin dilüsyonlarının absorbens değeri spektrofotometre ile 280 nm'de ölçülmüş ve değişen tirozin konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbens değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.1).

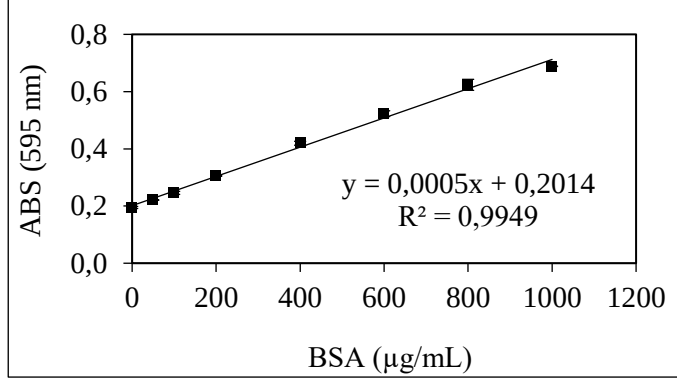


Şekil 4.1. Tirozin standart eğrisi.

Standart eğriye ait denklem kullanılarak, enzimin substratı hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amino asit miktarı µM tirozin eş değeri olarak hesaplanmıştır. Enzimin 1 dakikada serbest bıraktığı mikro mol (µmol) tirozin miktarı 1 ünite proteaz aktivitesi (U) olarak ifade edilmiştir. Buna göre, proteaz aktivitesi formül 4.3 yardımıyla hesaplanarak U/mL cinsinden verilmiştir.

$$\text{Proteaz aktivitesi} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{Tirozin eş değeri (}\mu\text{M)} \times \text{Toplam hacim (mL)}}{\text{Enzim miktarı (mL)} \times \text{Tepkime süresi (dk)}} \quad 4.3$$

Ayrıca, ham enzimin spesifik aktivite değeri belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle ham proteazın protein içeriği Bradford (1976) tarafından bildirilen yöntemle göre ve Bölüm 3.4.4.2’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Protein standardı olarak bovin serum albümini (BSA) kullanılmış (0-1000 µg/mL) ve en az beş farklı konsantrasyonda hazırlanan BSA için elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Ham proteazın toplam protein içeriği eğriye ait denklem kullanılarak hesaplanmış ve mg/mL BSA eş değeri olarak verilmiştir. Enzimin proteaz aktivitesi belirlendikten sonra spesifik aktivite 1 mg proteinin 1 dakikada serbest bıraktığı µmol tirozin miktarı (U/mg) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.2. BSA standart eğrisi.

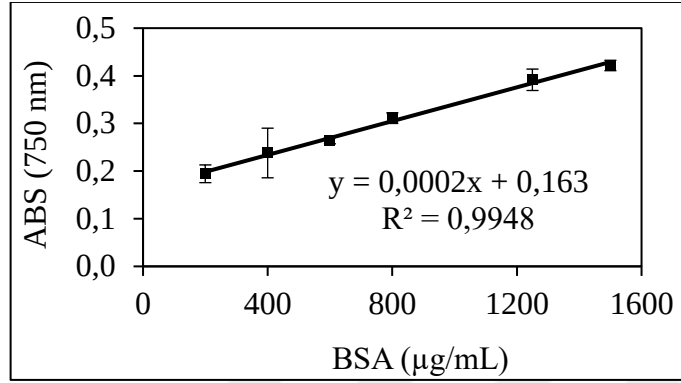
4.2.3. Siyez proteinlerinin hidrolizi

Proteolitik hidroliz için siyez protein izolatu (SPI) ve *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 ham proteazı kullanılmıştır. Substrat protein içeriği %5 olacak şekilde hazırlanmış, bu amaçla 18,657 g SPI (%67 protein içeriyor) 250 mL Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 9) çözündürülmüştür. Bunun için karışım 55 ± 5 °C'deki su banyosunda hafifçe karışım sağlanarak yaklaşık 20 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ham proteaz 2056 U/mL proteaz aktivitesine karşılık gelen miktarda tartılmış ve ultra saf suda çözündürülmüştür. Enzimatik tepkime koşullarından E/S oranının hidroliz üzerindeki etkisinin belirlenmesi için hidroliz üç farklı E/S oranında gerçekleştirilmiştir. Bunun için E/S %30, %40 ve %50 (h/h) olacak şekilde her bir substrata enzim çözeltisinden uygun hacimde ilave edilmiştir. Tepkime 60 °C'deki su banyosunda hafif karışım sağlanarak ve 5 sa süresince gerçekleştirilmiştir. Tepkimeyi sonlandırmak için E-S karışımı 95 ± 5 °C'deki su banyosunda 15 dk bekletilmiş ve ardından buz banyosunda soğutulup santrifüj edilmiştir (10,000 rpm, 22 °C, 30 dk). Çözünür hidrolize proteinleri ve peptitleri içeren sıvı üst faz toplanarak ortamdan alınmış ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş hidrolizat havanda ezilerek homojen yapı kazandırılmış ve elde edilen siyez protein hidrolizatı (SPH) ileri analizler için -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.3.1. Hidroliz derecesinin belirlenmesi

Siyez protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (HD), %10 (a/h) trikloroasetik asit (TCA)'teki çözünür protein içeriğinin, hidrolizatın toplam protein içeriğine oranı ile belirlenmiştir (Hoyle ve Meritt, 1994). Hidrolizatın toplam ve çözünür protein içeriği Lowry yöntemiyle tayin edilmiştir (Lowry ve ark, 1951). Tüm analizler Bölüm 3.5.1'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak BSA

kullanılmış, bu amaçla BSA distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (200-1500 µg/mL). BSA toplam protein içeriği için analiz edildikten sonra elde edilen absorbans değerleri ile değişen BSA konsantrasyonuna karşı standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. BSA standart eğrisi.

Hidrolizatlara ait toplam ve çözünür protein içeriği standart eğriden elde edilen denklem kullanılarak µg BSA eş değeri/mL cinsinden hesaplanmış ve ardından hidroliz derecesi formül 4.4 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\%HD = \frac{\text{Çözünür protein}}{\text{Toplam protein}} \times 100 \quad 4.4$$

4.2.3.2. Biyoaktif peptitlerin ultrafiltrasyon ile saflaştırılması

Siyez protein hidrolizatu ultra saf suda çözündürüldükten sonra teğetsel akış filtreleme (Tangential Flow Filtration/TFF) sisteminden geçirilmiştir. Ayırma işlemi için molekül ağırlığı ayırma sınırı (molecular weight cut-off-MWCO) değeri 1-10 kDa arasında değişen membran kasetleri (10 kDa, 5 kDa, 1 kDa) kullanılmıştır. Hidrolizat, moleküler ağırlığına (MA) göre dört farklı fraksiyona ayrılmıştır (MA > 10 kDa, 5 kDa < MA ≤ 10 kDa, 1 kDa < MA ≤ 5 kDa, MA ≤ 1 kDa). Fraksiyonlar liyofilizatör ile kurutulmuş ve biyolojik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi için -18°C’de muhafaza edilmiştir.

4.2.4. Hidrolizatların antioksidan özelliklerinin belirlenmesi

Hidrolizatların antioksidan aktivitesi *in vitro* yöntemler ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda DPPH ve ABTS serbest radikalini giderim aktivitesi, demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve toplam fenolik madde içeriği belirlenmiştir.

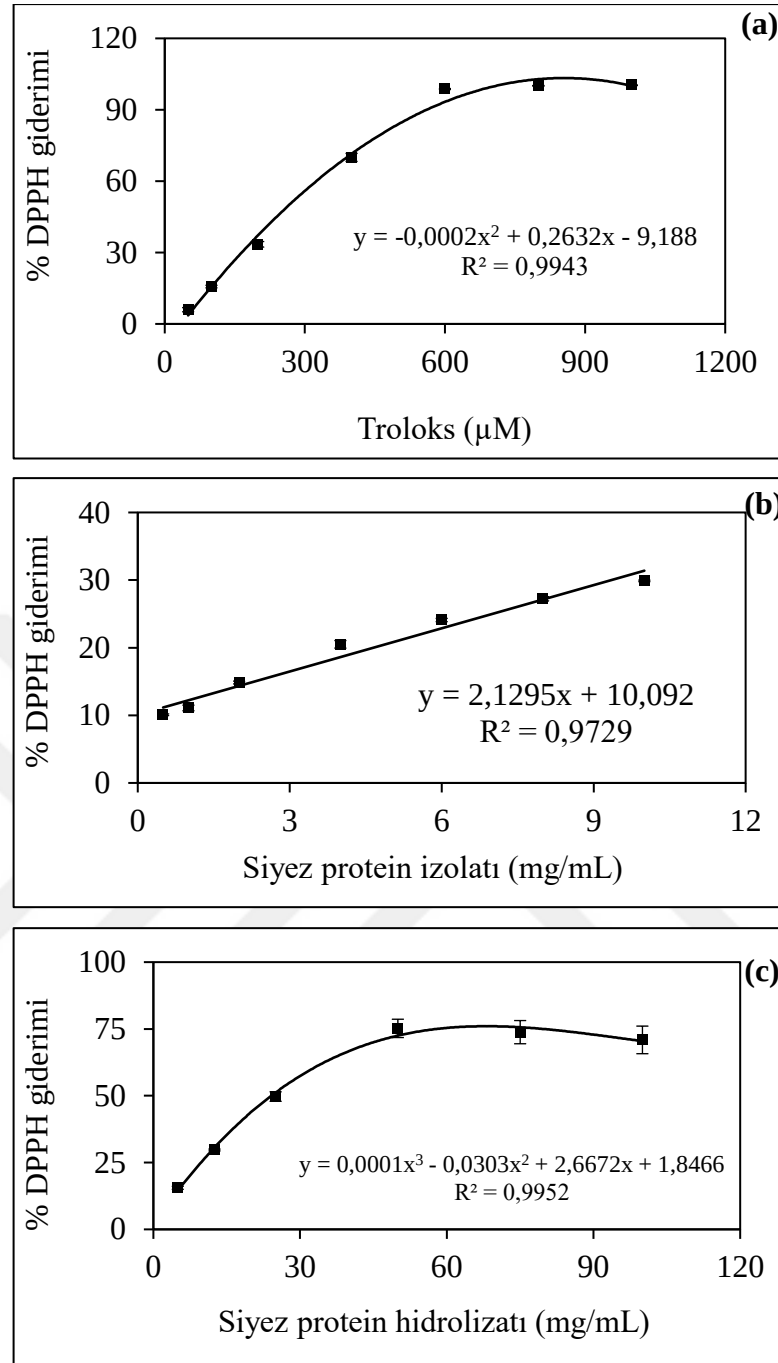
4.2.4.1. DPPH gideriminin belirlenmesi

DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikalinin giderim aktivitesi Osukoya ve ark. (2020) tarafından bildirilen yöntemle göre ve Bölüm 3.5.3.1’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, protein hidrolizatının ve peptit fraksiyonlarının DPPH giderimi için yarı-maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC50) belirlenmiştir. IC50 değeri, bir bileşiğin kimyasal bir süreçteki etkinliğini/gücünü ifade etmede yaygın kullanılan bir ölçü birimi olup DPPH radikalının %50 oranında gideriminin sağlanması için ihtiyaç duyulan örnek miktarını belirtmiştir (Aykul ve Martinez-Hackert, 2016).

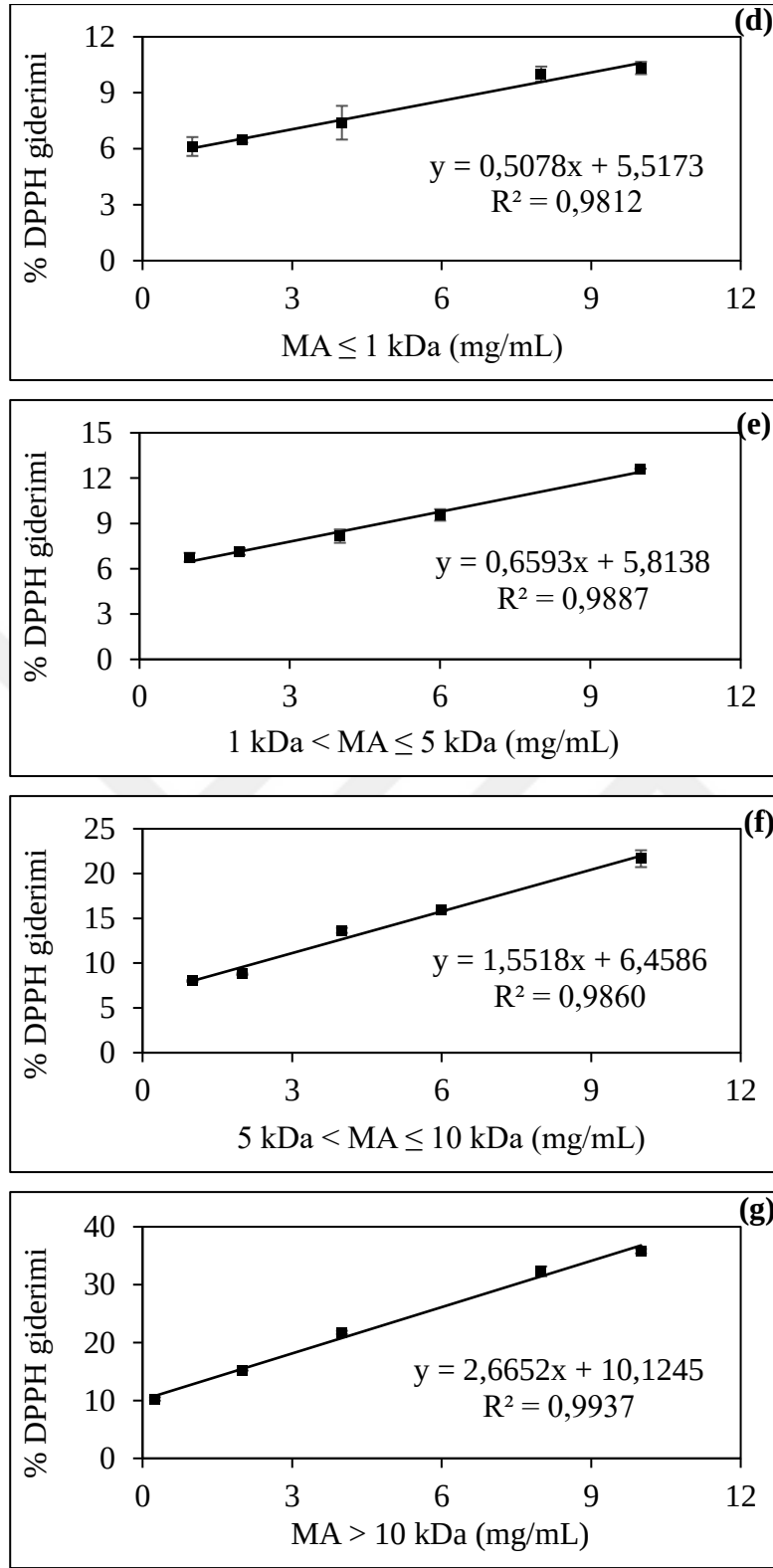
IC50 değerinin belirlenmesi için örnekler farklı konsantrasyonda hazırlanmış (hidrolizat: 5-100 mg/mL (ultra saf suda), peptit fraksiyonları: 1-10 mg/mL (ultra saf suda), siyez protein izolatu (SPI): 0,5-10 mg/mL (100 mM, pH 9 Tris-HCl tamponunda)) ve örneklerin DPPH giderim aktivitesi hesaplanmıştır (4.5). Pozitif kontrol olarak troloks (etil alkolde) (50-1000 µM) kullanılmıştır. ($A_{\text{Örnek}} = 0,1$ mL hidrolizat + 3 mL DPPH, $A_{\text{Kontrol}} = 0,1$ mL distile su + 3 mL DPPH, $A_{\text{Kör}} = 0,1$ mL hidrolizat + 3 mL %70 etanol)

$$\% \text{ DPPH giderimi} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{Örnek}} - A_{\text{Kör}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \right) \times 100 \quad 4.5$$

Örneklerin değişen konsantrasyonuna karşı elde edilen DPPH giderim aktivitesi değerleri ile eğri oluşturulmuş (Şekil 4.4) ve eğri denklemi yardımıyla IC50 değerleri hesaplanarak mg/mL cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 4.4. Değişen örnek konsantrasyonu için DPPH % giderim grafiği. a) Trolox b) Siyez protein izolatu c) Siyez protein hidrolizatu d) $MA \leq 1$ kDa peptit fraksiyonu e) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa peptit fraksiyonu f) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa peptit fraksiyonu g) $MA > 10$ kDa peptit fraksiyonu.



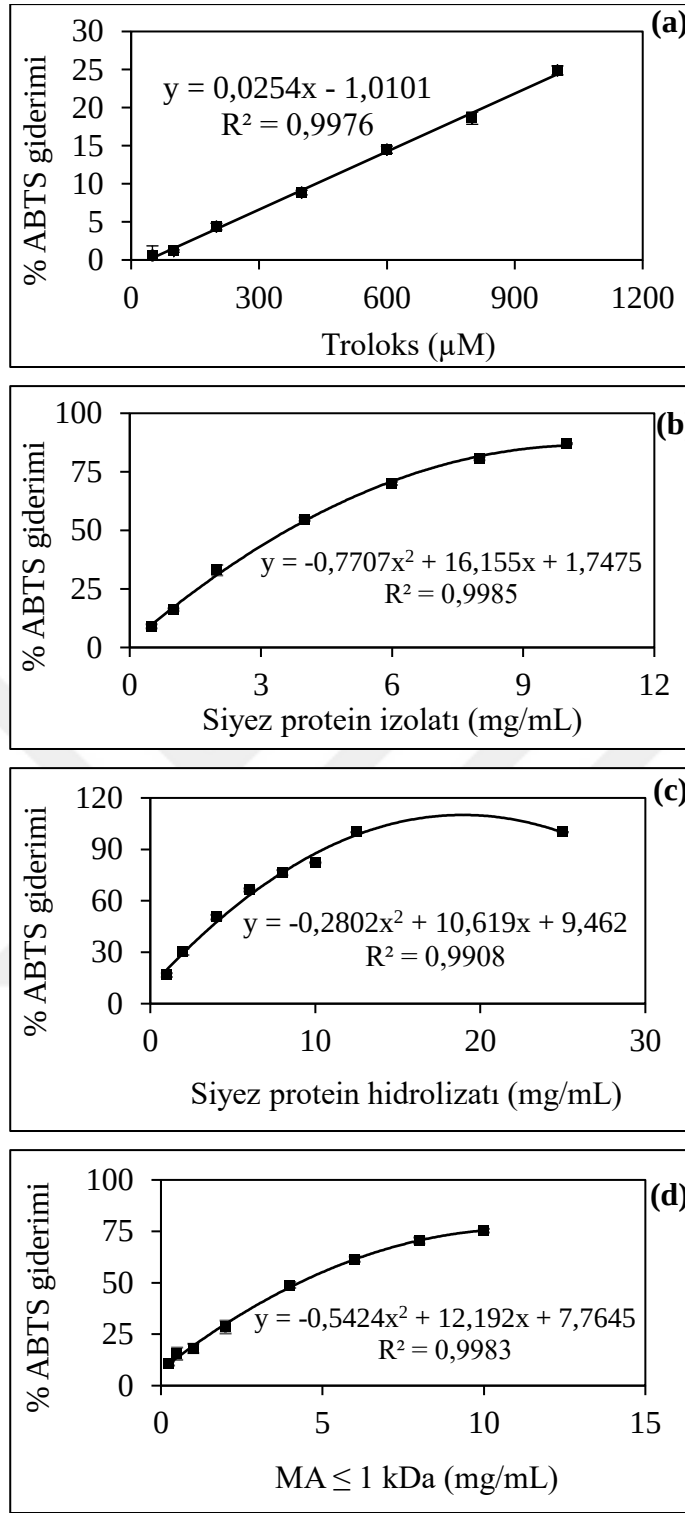
Şekil 4.4. (Devamı) Değişen örnek konsantrasyonu için DPPH % giderim grafiği. a) Troloks b) Siyez protein izolatı c) Siyez protein hidrolizatı d) $MA \leq 1$ kDa peptit fraksiyonu e) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu f) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu g) $MA > 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu.

4.2.4.2. ABTS gideriminin belirlenmesi

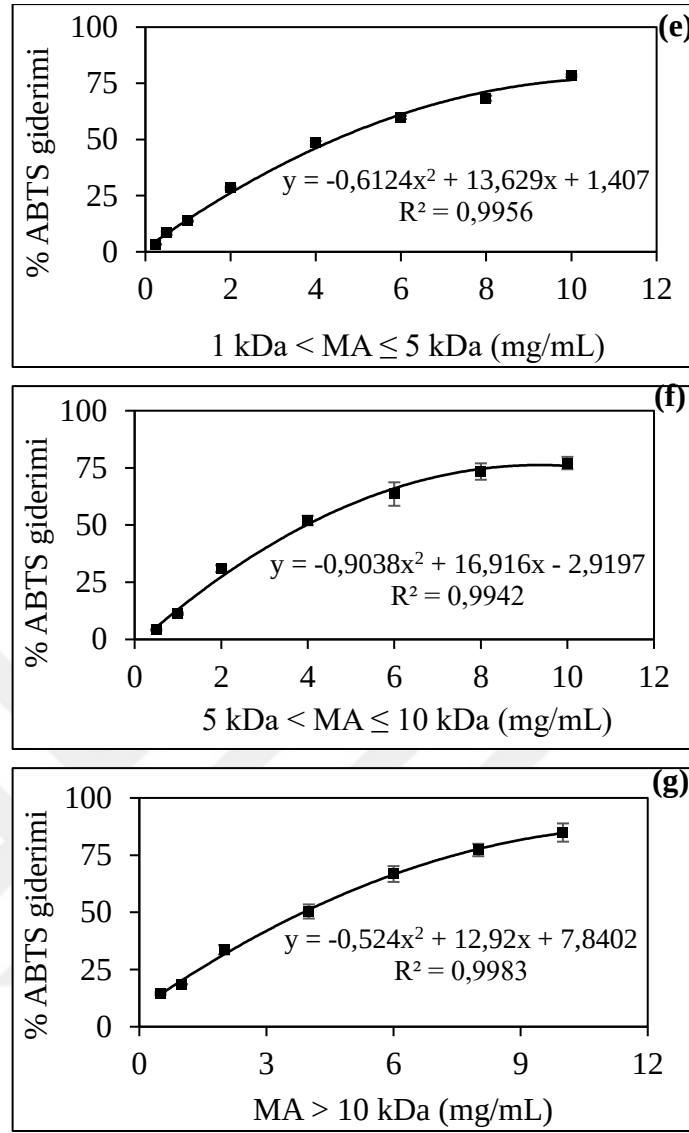
ABTS radikal giderim aktivitesi Re ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntemle göre ve Bölüm 3.5.3.2’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre 7 mM ABTS stok çözeltisi 2,45 mM amonyum persülfat ile 1:1 oranında (h/h) karıştırılmış ve $ABTS^{\circ+}$ radikalinin oluşumu için karanlıkta ve oda sıcaklığında 16 saat bekletilmiştir. $ABTS^{\circ+}$ radikali, 734 nm’deki absorbans değeri $0,700 \pm 0,0005$ ölçülene kadar fosfat tamponlu tuzlu su (pH 7,4) ile seyreltilmiştir. Hidrolizattan 50 µL alınarak 3 mL $ABTS^{\circ+}$ radikaline aktarılmış ve vorteks ile birkaç saniye karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 6 dk bekletilmesinin ardından örnekler için absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 734 nm’de ölçülmüştür. Kontrol için SPI hariç tüm örneklerde örnek yerine aynı hacimde distile su kullanılmıştır. SPI için Tris-HCl tamponu pH 9 (100 mM) kontrol olarak kullanılmıştır. Örneklerin % ABTS giderim aktivitesi formül 4.6’ya göre belirlenmiştir.

$$\% ABTS \text{ giderimi} = \left(\frac{A_{Kontrol} - A_{Örnek}}{A_{Kontrol}} \right) \times 100 \quad 4.6$$

IC50 değerinin belirlenmesi için örnekler farklı konsantrasyonda hazırlanmış (hidrolizat: 1-25 mg/mL (ultra saf suda), peptit fraksiyonları: 0,25-10 mg/mL (ultra saf suda), siyez protein izolatu (SPI): 0,5-10 mg/mL (100 mM, pH 9 Tris-HCl tamponunda)) ve örneklerin ABTS giderim aktivitesi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak troloks (etil alkolde) (50-1000 µM) kullanılmıştır. Örneklerin değişen konsantrasyonuna karşı elde edilen ABTS giderim aktivitesi değerleri ile eğri oluşturulmuş (Şekil 4.5) ve eğri denklemini yardımıyla IC50 değerleri hesaplanarak mg/mL cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 4.5. Değişen örnek konsantrasyonu için ABTS % giderim grafiği. a) Troloks b) Siyez protein izolatu c) Siyez protein hidrolizatu d) MA ≤ 1 kDa peptit fraksiyonu e) 1 kDa < MA ≤ 5 kDa peptit fraksiyonu f) 5 kDa < MA ≤ 10 kDa peptit fraksiyonu g) MA > 10 kDa peptit fraksiyonu.



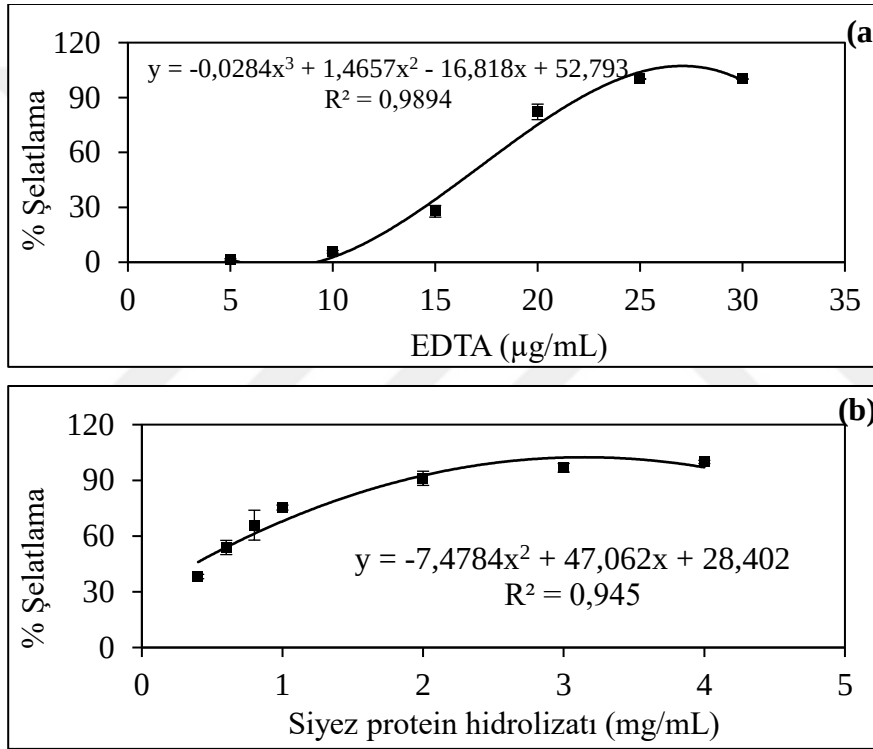
Şekil 4.5. (Devamı) Değişen örnek konsantrasyonu için ABTS % giderim grafiği. a) Troloks b) Siyez protein izolatı c) Siyez protein hidrolizatı d) MA ≤ 1 kDa peptit fraksiyonu e) 1 kDa < MA ≤ 5 kDa peptit fraksiyonu f) 5 kDa < MA ≤ 10 kDa peptit fraksiyonu g) MA > 10 kDa peptit fraksiyonu.

4.2.4.3. Demir (II) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

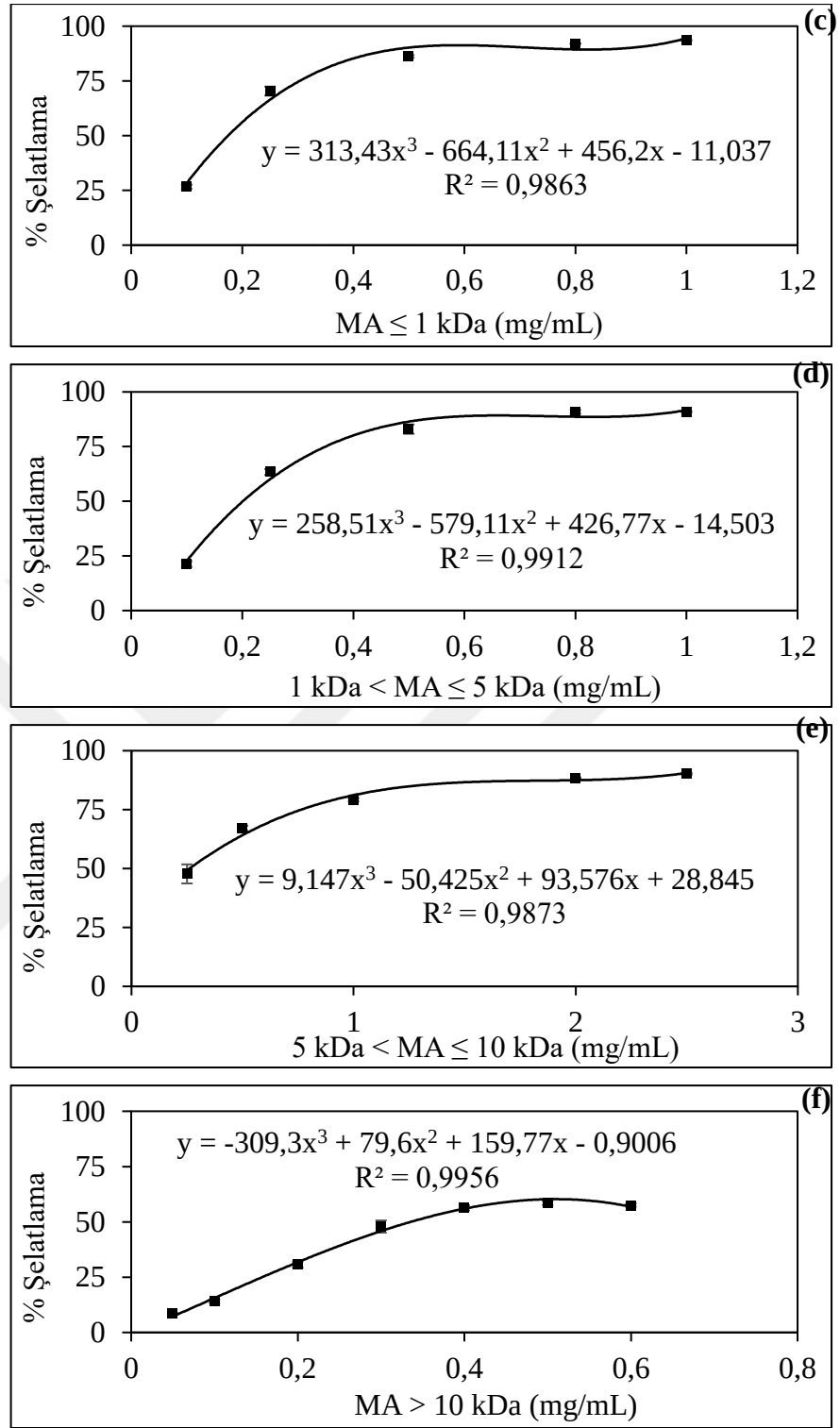
Demir (II) iyonunu şelatlama aktivitesi Karami ve ark. (2019) tarafından bildirilen yönteme göre belirlenmiştir. Buna göre, 3 mL örnek 0,1 mL FeCl₂ (2 mM) ile karıştırılmış ve 3 dk sonra 0,2 mL Ferrozine (5 mM) ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometre ile 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol olarak örnek yerine aynı hacimde distile su kullanılmıştır. Örneklerin % şelatlama aktivitesi formül 4.7’ye göre belirlenmiştir.

$$\% \text{ Şelatlama} = \left(\frac{A_{Kontrol} - A_{\text{örnek}}}{A_{Kontrol}} \right) \times 100 \quad 4.7$$

IC50 değerinin belirlenmesi için örnekler farklı konsantrasyonda hazırlanmış (hidrolizat: 0,4-4 mg/mL (ultra saf suda), peptit fraksiyonları: 0,05-2,5 mg/mL (ultra saf suda)) ve örneklerin şelatlama aktivitesi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak EDTA (ultra saf suda) (5-30 µg/mL) kullanılmıştır. Örneklerin değişen konsantrasyonuna karşı elde edilen metal şelatlama aktivitesi değerleri ile eğri oluşturulmuş (Şekil 4.6) ve eğri denklemleri yardımıyla IC50 değerleri hesaplanarak mg/mL cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. Değişen örnek konsantrasyonu için % metal şelatlama aktivitesi grafiği. a) EDTA b) Siyez protein hidrolizatı c) $MA \leq 1$ kDa peptit fraksiyonu d) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa peptit fraksiyonu e) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa peptit fraksiyonu f) $MA > 10$ kDa peptit fraksiyonu.

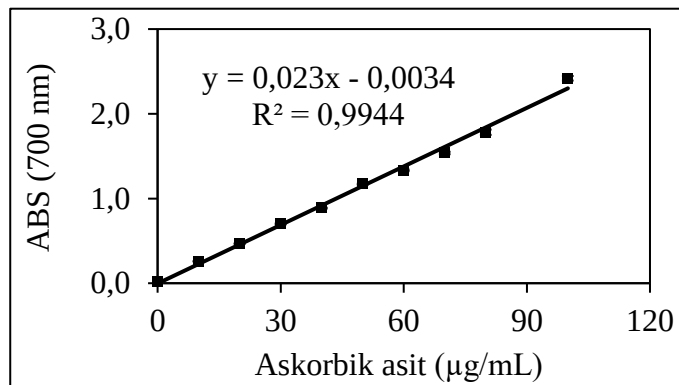


Şekil 4.6. (Devamı) Değişen örnek konsantrasyonu için % metal şelatlama aktivitesi grafiği. a) EDTA b) Siyez protein hidrolizatı c) $MA \leq 1$ kDa peptit fraksiyonu d) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu e) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu f) $MA > 10 \text{ kDa}$ peptit fraksiyonu.

4.2.4.4. Demir iyonu indirgeyici antioksidan gücün belirlenmesi

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç Oyaizu (1986) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Örnek ultra saf ile %1 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanmış ve 1 mL örnek ile 1 mL potassium ferrisiyanür (%1 a/h) karıştırılmıştır. Karışıma 1 mL sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH 6,6) ilave edilerek vorteks ile karıştırılmış ve karışım 50 °C'deki su banyosunda 20 dk inkübe edilmiştir. Kimyasal tepkime, 1 mL TCA (%10 a/h) ilavesi ile durdurulmuş ve örnekler buz banyosunda soğutulduktan sonra santrifüj edilmiştir (4000 rpm, 10 dk, 20 °C). Üst faz toplanarak içerisinde 1 mL alınmış ve 1 mL ultra saf su ve 0,2 mL FeCl₃ (%0,1 a/h) ile karıştırılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra spektrofotometre ile 700 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme gücünü göstermektedir.

Antioksidan standardı olarak askorbik asit kullanılmış, bu amaçla askorbik asit distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (0-100 µg/mL). Askorbik asidin indirgeme gücü analiz edilerek 700 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve değişen askorbik asit konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.7). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların indirgeme gücü µg askorbik asit eş değeri (AAE)/mL olarak ifade edilmiştir.

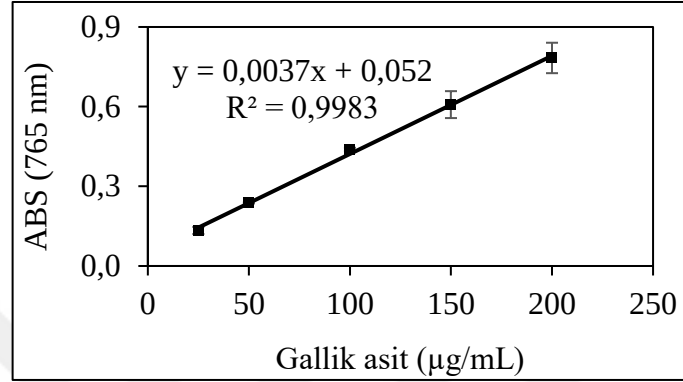


Şekil 4.7. Askorbik asit standart eğrisi.

4.2.4.5. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi

Toplam fenolik madde (TFM) içeriği, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak Bölüm 3.5.3.4'te belirtildiği şekilde tayin edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Fenolik bileşik standardı olarak gallik asit kullanılmış, bu amaçla gallik asit distile suda çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları

hazırlanmıştır (25-200 µg/mL). Gallik asidin TFM içeriği analiz edilerek 765 nm’de absorbans değerleri ölçülmüş ve değişen gallik asit konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.8). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların TFM içeriği µg gallik asit eş değeri (GAE)/mL olarak ifade edilmiştir.



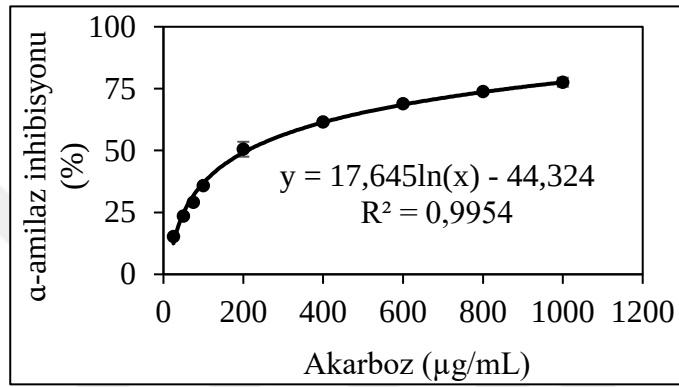
Şekil 4.8. Gallik asit standart eğrisi.

4.2.5. α-Amilaz inhibitör aktivitenin belirlenmesi

α-amilaz inhibitör aktivite, Awosika ve Aluko (2019) tarafından bildirilen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Liyofilize peptit fraksiyonları, SPH ve SPI 20 mM sodyum fosfat tamponunda (6,7 mM sodyum klorür içeriyor, pH 6,9) son konsantrasyon 10 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüştür. Örnekten 100 µL alınarak 100 µL α-amilaz çözeltisi (1,125 U/mL) ile karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra, karışıma 20 mM sodyum fosfat tamponunda çözündürülmüş nişastadan (%1, a/h) 100 µL ilave edilmiştir. Tepkimenin gerçekleşmesi için 10 dk beklenmiş ve ardından karışıma 200 µL dinitrosalisilik asit (DNSA) reaktifinden (96 mM 3,5-DNSA, 2 M sodyum hidroksit ve 5,3 M potasyum sodyum tartrat tetrahidrat içeriyor) ilave edilmiştir. Enzim aktivasyonunu durdurmak için karışım kaynar su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 3 mL ultra saf su ilave edilerek karıştırılmış ve spektrofotometre ile 540 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol olarak akarboz yerine aynı hacimde sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Örneklerin α-amilaz inhibitör aktivitesi formül 4.8’e göre belirlenmiştir.

$$a - \text{amilaz inhibisyonu (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \right) \times 100 \quad 4.8$$

Pozitif kontrol olarak, sentetik bir α -amilaz inhibitörü olan akarboz kullanılmış, bu amaçla akarboz sodyum fosfat tamponunda (20 mM, pH 6,9) çözündürüldükten sonra en az beş farklı konsantrasyonda seri dilüsyonları hazırlanmıştır (25-1000 $\mu\text{g/mL}$). Akarbozun α -amilaz inhibitör aktivitesi analiz edilerek 540 nm’de absorbans değerleri ölçülmüş ve değişen akarboz konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.9). Standart eğriye ait denklem kullanılarak hidrolizatların α -amilaz inhibitör aktivitesi μg akarboz eş değeri/mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Akarboz standart eğrisi.

4.2.6. Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi

4.2.6.1. Emülsiyon özelliklerinin belirlenmesi

Hidrolizatların emülsiyon oluşturma özellikleri Pearce ve Kinsella (1978) tarafından bildirilen yönteme göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0,5 g örnek 30 mL Tris-HCl tamponuyla (pH 9, 100 mM) karıştırıldıktan sonra üzerine 10 mL kanola yağı ilave edilmiştir. Analiz Bölüm 3.5.4.1’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve EAİ ve ESİ sırasıyla formül 4.9 ve 4.10 kullanılarak hesaplanmıştır (Pearce ve Kinsella, 1978).

$$EAİ (m^2/g) = [2 \times 2,303 \times A \times DF] / [I \times \phi \times C] \quad 4.9$$

$$ESİ (dk) = A \times \Delta t / \Delta A \quad 4.10$$

A: Emülsiyonun 500 nm’deki absorbans değeri, DF: Dilüsyon faktörü, I: Küvetin ışık yolu (m), ϕ : Yağ hacim fraksiyonu (0,25), C: Sıvı fazdaki protein konsantrasyonu (g/m^3), $\Delta A = A_0 - A_{10}$, $\Delta t = 10$ dk.

4.2.6.2. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi

Yağ tutma kapasitesi Bölüm 3.5.4.2’de açıklandığı şekilde (50 mg örnek + 1,5 mL kanola yağı) belirlenmiş ve g yağ/g örnek olarak ifade edilmiştir (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013).

4.2.6.3. Köpürme özelliklerinin belirlenmesi

Köpürme kapasitesi Senadheera ve ark. (2023) tarafından rapor edilen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Elli mL hacmindeki Falcon tüp içerisine 100 mg ($\pm 0,5$ mg) örnek tartılmış ve üzerine 20 mL Tris-HCl tamponu (pH 9, 100 mM) eklenmiştir. Karışım 20,000 rpm hızındaki homojenizatör ile 2 dk karıştırılmıştır (Prob: S18N). Köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi sırasıyla formül 4.11 ve 4.12 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Köpürme kapasitesi (\%)} = \left[\frac{(A_0 - B)}{B} \right] \times 100 \quad 4.11$$

$$\text{Köpük stabilitesi (\%)} = \left[\frac{(A_{30} - B)}{(A_0 - B)} \right] \times 100 \quad 4.12$$

A₀: Çırpma işleminden hemen sonraki hacim (mL), A₃₀: Çırpma işleminden 30 dk sonraki hacim (mL), B: Çırpma işleminden önceki hacim (mL).

4.2.7. Yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi

Hidrolizatın ve peptit fraksiyonlarının yüzey hidrofobisitesi (H₀) ANS hidrofobik floresan boya ile boyama yöntemine göre belirlenmiştir (Yang ve ark, 2018). ANS, potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,0) ile son konsantrasyon 8 mM olacak şekilde çözündürülmüştür. Örnekler potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,0) ile karıştırılarak 0,025-0,4 mg/mL aralığında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (Siyez protein izolatu Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 9) çözündürülmüştür). Analiz için örnek dilüsyonundan 1 mL alınarak 10 µL ANS çözeltisi ile karıştırılmış ve kuyucuklu opak plakaya 200 µL hacminde aktarılmıştır. İki dakika sonra floresan yoğunluğu uyarılma ve emisyon (yayma) dalga boyları sırasıyla 390 ve 470 nm olan plaka okuyucuda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Floresan ölçümü öncesi plaka 10 sn çalkalanmıştır. Kör olarak 200 µL örnek dilüsyonunun floresan yoğunluğu ölçülerek örneklerin net floresan yoğunluğu (ANS varken floresan yoğunluğu - ANS yokken floresan yoğunluğu) belirlenmiştir. Yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi için değişen örnek konsantrasyonuna karşı elde edilen net floresan yoğunluğu değerleri ile eğri

oluşturulmuş ve eğri denkleminde elde edilen eğim katsayısı yüzey hidrofobisite indeksi (H_0) olarak ifade edilmiştir.

4.2.8. Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi

Hidrolizat ve peptit fraksiyonları Fourier Dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopi analizi ve zeta potansiyelinin belirlenmesi ile fiziksel ve kimyasal özellikleri için karakterize edilmiştir. FTIR analizi $4000-800\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir (Çözünürlük: 4, Tarama sayısı: 128). Örnekler analiz öncesi oda sıcaklığındaki vakumlu evaporatörde yaklaşık iki gün bekletilmiştir. Yüz mili gram KBr $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki etüvde bekletilip nemi uzaklaştırıldıktan sonra 1 mg örnek ile karıştırılmıştır. Karışım homojen bir görünüm elde edilene dek havanda ezilmiş ve sonra ince şeffaf film formu kazandırılmak üzere pnömatik pres ile şekillendirilmiştir. Hazırlanan örneklerin FTIR spektroskopi cihazı ile % transmittans (geçirgenlik) değerleri ölçülmüştür.

Zeta potansiyeli ölçümlerinde zeta potansiyeli analizörü kullanılmıştır. Örnekler ultra saf suda çözündürülüp absorbansı 0,001 değerine ayarlandıktan sonra ölçüm gerçekleştirilmiştir (Kırılma indisi: 1,33; dengeleme süresi: 120 sn). Her bir örnek için en az üç farklı paralel okuma gerçekleştirilmiş ve tek paralel için 100 adet ölçüm yapılmıştır. Paralellerin ortalaması alınarak zeta potansiyeli değeri ortalama $\pm$ standart sapma (mV) olarak ifade edilmiştir.

4.2.9. Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi

Siyez proteinleri ve peptit fraksiyonunun amino asit kompozisyonu Bidlingmeyer ve ark. (1987) tarafından bildirilen yönteminde ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Analiz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UV detektörü) ile gerçekleştirilmiştir. Amino asit profilinin belirlenmesi için toz haldeki örnek 0,1 N HCl'de çözündürülmüş ve $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de geri soğutucu sistemi altında 24 saat hidroliz edilmiştir. Hidrolize örnekten 10 mL alınarak 0,1 N HCl ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek $0,22\text{ }\mu\text{m}$ membran filtreden geçirilmiş ve toplam amino asit içeriği g/100 g olarak ifade edilmiştir. Harici standart olarak 19 amino asit (aspartik asit (Asp), glutamik asit (Glu), serin (Ser), glutamin (Gln), histidin (His), glisin (Gly), treonin (Thr), arjinin (Arg), alanin (Ala), tirozin (Tyr), sistein (Cys), valin (Val), metiyonin (Met), triptofan (Trp), fenilalanin (Phe), izolösin (Ile), lösin (Leu), lisin (Lys) ve prolin (Pro)) kullanılmıştır.

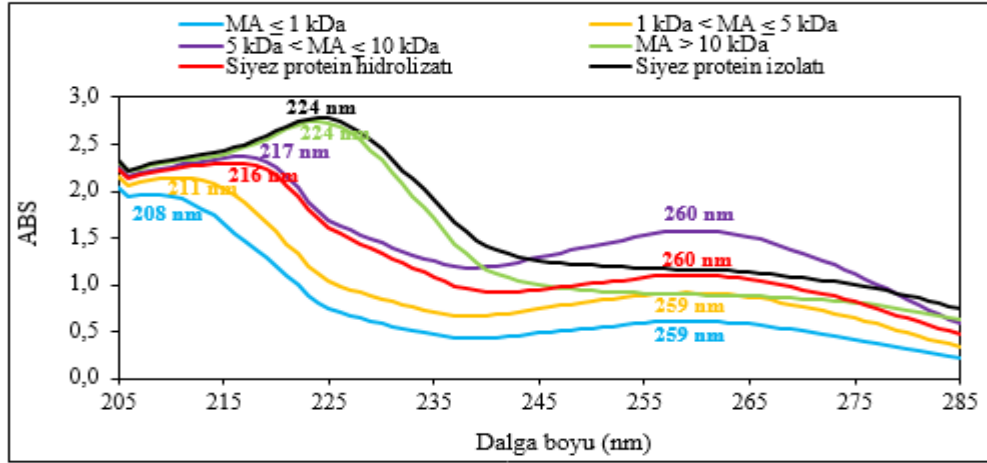
4.2.10. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ileri saflaştırma ve diyaliz

Ultrafiltrasyon ile elde edilen peptit fraksiyonunun ileri saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş, bunun için hidrofobik etkileşim kromatografisinden yararlanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) biyolojik bileşiklerin ayırımında kullanılan bir tekniktir (Roettger ve Ladisch, 1989). Bu teknikte, biyomakromoleküllerin hidrofobik bölgelerinin adsorban maddedeki hidrofobik ligandlara bağlanması prensibinden yararlanılır. Bu bağlanma, yüksek tuz konsantrasyonuna sahip sulu bir çözelti gibi hidrofobik etkileşimi destekleyen bir ortamda meydana gelir. Çözücünün polaritesi, HEK adsorbanı ile protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri güçlendirebilen veya zayıflatabilen tuzların veya organik çözücülerin ilavesiyle kontrol edilebilmektedir (McCue, 2009). HEK ile ters fazlı sıvı kromatografisine benzer şekilde biyomakromoleküller hidrofobik özelliklerine göre ayrılabilirken, denatüre edici olmayan koşullar altında proteinlerin üç boyutlu yapısı ve biyolojik aktivitelerinin çoğunlukla korunuyor olması bu tekniğin avantajlarından biridir (Fausnaugh ve ark, 1984).

Analizde kolon dolgu maddesi (resin) olarak Butyl Sepharose 4 Fast Flow kullanılmıştır. Resin kolona paketlenmeden önce sırasıyla %20 etanol (600 mL) ve 0,2 M amonyum sülfat çözeltisi (800 mL) ile 0,22 µm vakum filtreden geçirilerek yıkanmıştır. Ardından 400 mL resin 1 L hacmindeki kolona yüklenmiş ve tamamen çökünceye dek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hareketli (yürütücü/mobil) faz olarak 0,2 M amonyum sülfat (20 mM sodyum fosfatta hazırlanmış, pH 7,0) ve 20 mM sodyum fosfat (pH 7,0) çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 0,22 µm vakum filtresinden geçirilmiş ve ultrasonikatörde 20 dk bekletilmiştir.

Ayırma işleminde kullanılacak peptit fraksiyonu ultra saf suda çözündürülmüş (15 mg/mL) ve 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra kolona yavaşça yüklenmiştir. Elüsyonlar 0,2 M amonyum sülfat çözeltisi eşliğinde ve akış hızı 2 mL/40 sn olacak şekilde mikro tüplere (2 mL) manuel olarak toplanmıştır. Yaklaşık 300 mL elüsyon toplandıktan sonra ayırma işlemine hareketli faz olarak 20 mM sodyum fosfat (pH 7,0) çözeltisi ile devam edilmiş (630 mL) ve elüsyonlar benzer şekilde toplanmıştır. Her bir tüp içerisine toplanan elüsyondan 96 kuyucuklu UV plakaya 200 µL aktarılmış ve mikro plaka okuyucuda absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir kuyucuktan en az üç paralel olacak şekilde aktarma yapılmıştır. Absorbans ölçümünün gerçekleştirileceği dalga boyunun belirlenmesi amacıyla peptit bağlarının UV ışığı en fazla absorbe ettiği

dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır. Bunun için peptit çözeltisinin (1 mg/mL) 205-285 nm dalga boyu aralığındaki absorbans değerleri ölçülmüş ve en yüksek absorbansın elde edildiği değer (pik noktası) ölçümün yapılacağı dalga boyu olarak seçilmiştir (Şekil 4.10). Böylece, toplanan elüsyonların absorbans değerleri ölçülmüş ve kullanılan tampon çözeltinin absorbans değeri çıkarılarak örneklerin zamana karşı absorbansı belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının absorbans spektrumu.

Spektrum taraması sonucunda belirlenen sabit dalga boyunda elüsyonların absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbansın zamana bağlı değişimini gösteren bir kromatogram hazırlanarak ileri fraksiyonlar belirlenmiş ve bu fraksiyonlara ait tüplerdeki elüatlar bir araya toplanmıştır. Elüatlardaki tampon çözeltiden kaynaklanan tuz iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için fraksiyonlar diyaliz membranına (MWCO: 3,5 kDa, 1 m) yüklenerek orta şiddette akış halindeki soğuk distile suya karşı bir gece boyunca diyaliz edilmiştir. Tuz iyonları uzaklaştırılan ileri peptit fraksiyonları liyofilizatörde kurutulmuştur.

4.2.11. Proteinlerin tanımlanması

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile hidrofobik karakterine göre ayrılan fraksiyonlar kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Bu doğrultuda fraksiyonların içeriğindeki proteinler türü ve moleküler büyüklüğü için teorik olarak tanımlanmıştır. Bunun için peptit örnekleri kullanıma hazır SDS-PAGE jeline yüklendikten sonra kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Analiz, Alberta Üniversitesi Katz Grup Eczacılık ve Sağlık Araştırmaları Merkezi'ne bağlı Proteomik ve Kütle Spektrometrisi Tesisi'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

4.3. İstatistiksel Analizler

Bütün analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel veri analizi IBM SPSS Statistics 20 programı ile yapılmıştır. Grup ortalamalarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Çoklu grup karşılaştırmalarında homojen varyanslar için Tukey, homojen olmayan varyanslar için Games-Howell post hoc testleri $p < 0,05$ önem düzeyinde uygulanmıştır.

4.4. Bulgular ve Tartışma

4.4.1. Protein içeriği ve ekstraksiyon verimi

Siyez unu, siyez protein izolatu (SPI) ve ham proteazın Leco azot analizatörü ile elde edilen toplam (ham) protein içeriği değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Buna göre siyez ununun protein içeriği 14,8 g (100 g KM’de) tespit edilmiştir. Bölüm 3.7.1’de siyez ununun protein içeriği Kjeldahl azot analizi sonucu $12,5 \pm 0,4$ g (100 g KM’de) olarak belirlenmiştir. Aynı un türü için elde edilen farklı protein içeriği değerlerinin, protein ve nem tayini için seçilen analiz yöntemlerindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. SPI ve ham proteazın protein içeriği sırasıyla %67,0 ve %63,1’dir. SPI için ekstraksiyon verimi, undan izole edilen protein miktarının unun toplam protein miktarına oranı ile belirlenmiş ve $20,7 \pm 0,0$ olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Siyez unu, protein izolatu ve ham proteazın kuru madde ve toplam protein içeriği.

Örnek	Kuru madde (%)	Protein (%)*	% Protein (KM’de)
Siyez unu	$91,3 \pm 0,0$	$13,5 \pm 0,0$	$14,8 \pm 0,0$
Siyez protein izolatu	$96,5 \pm 0,1$	$67,0 \pm 0,1$	$69,4 \pm 0,1$
Ham proteaz	$98,4 \pm 0,1$	$63,1 \pm 0,1$	$64,1 \pm 0,1$

*N-dönüşüm faktörü siyez unu ve protein izolatu için 5,7; ham proteaz için 6,25 olarak alınmıştır.

Seçilen ekstraksiyon koşullarında, buğday proteinlerinin prolamin olmayan gruptaki suda çözünür albüminler ile prolamin gruptaki alkali pH’da çözünür glütenin proteinleri izole edilmiştir. Buğday proteinlerinin büyük bir kısmını glüten proteinleri oluşturmakta ($\sim$ %80), glüten proteinlerinden gliadin ise toplam protein içeriğinin yaklaşık %40’ını oluşturmaktadır (Shewry, 2019). SPI’nin protein ekstraksiyon verimi görece düşük olsa da ayrıştırılması hedeflenen proteinler bakımından zengin olduğu görülmektedir.

4.4.2. Proteaz aktivitesi

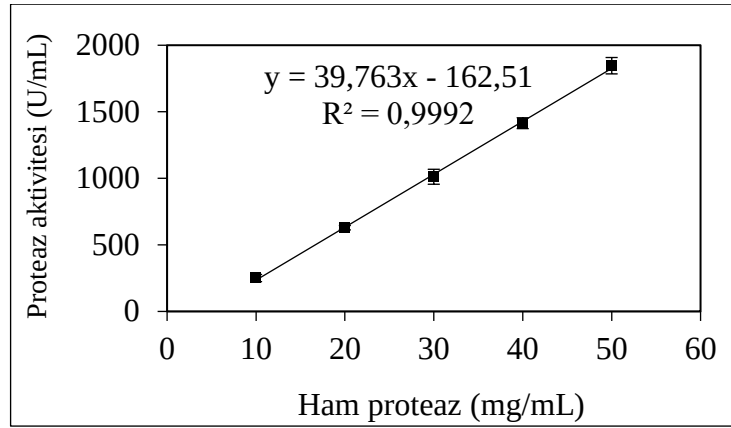
Ham proteazın proteaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Proteaz aktivite değerleri 251-1846 U/mL arasında tespit edilmiş ve artan enzim miktarına bağlı olarak proteaz aktivitesi değerlerinde anlamlı bir yükseliş görülmüştür. Enzimin spesifik aktivitesi en düşük 10 mg/mL enzim için ve 10899 U/mg, en yüksek 50 mg/mL enzim için ve 12390 U/mg olarak elde edilmiş; ancak enzim miktarına bağlı spesifik aktivitede anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.3. Ham proteazın proteaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri.

Ham proteaz konsantrasyonu (mg/mL)	Proteaz aktivitesi (U/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)
10	251 ± 27^e	10899 ± 1175^a
20	629 ± 17^d	11866 ± 312^a
30	1012 ± 56^c	11370 ± 632^a
40	1414 ± 41^b	12192 ± 351^a
50	1846 ± 62^a	12390 ± 414^a

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$). (Ham proteaz ultra saf suda çözündürülmüştür.)

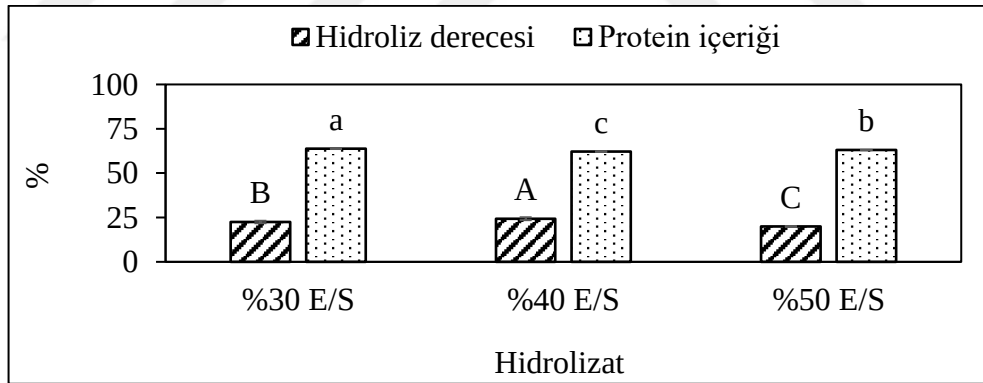
Ham proteazın optimum aktivite koşullarında sergilediği ve en yüksek proteaz aktivitesi olan 2056 U/mL değerine ulaşmak için ihtiyaç duyulan enzim konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bunun için enzim konsantrasyonu ve proteaz aktivitesi değerleri ile elde edilen eğri (Şekil 4.11) denkleminde yararlanılmış ve enzim konsantrasyonu 55,8 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Ham proteazın değişen konsantrasyonlarına bağlı elde edilen proteaz aktivitesi eğrisi.

4.4.3. Hidroliz derecesi ve protein içeriği

Ham proteaz ile farklı E/S oranlarında (%30-50 h/h) üretilen siyez protein hidrolizatlarının % HD ve protein içeriği Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Hidroliz derecesi E/S %30 için $22,5 \pm 0,7$; %40 için $24,3 \pm 0,8$ ve %50 için $19,9 \pm 0,0$ olarak belirlenmiştir. Hidrolizatların protein içeriği E/S %30, 40 ve 50 için sırasıyla $63,8 \pm 0,1$; $62,2 \pm 0,1$ ve $63,0 \pm 0,1$ ’dir.



Şekil 4.12. Ham proteaz ile farklı E/S oranında (h/h) üretilen siyez protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi ve protein içeriği. Üretim koşulları: 60 °C, pH 9, 5 saat. Proteaz aktivitesi: 2056 U/mL.

*Aynı seride farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).

Hidroliz derecesi (HD), parçalanmış peptit bağlarının sayısı için gösterge niteliğinde olup proteinlerin fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri üzerinde etkili olan en önemli parametrelerdendir (Abbasi ve ark, 2022). Araştırmalar peptit biyoaktivitesinin korunması ve iyileştirilmesi için hafif (ılımlı) düzeyde hidroliz önermektedir. Aşırı düzeyde hidrolizin peptidin biyoaktif özelliklerinde, özellikle antioksidan etkinliğinde

olumsuz etki yarattığı bilinmektedir. Ayrıca, bazı çalışmalar hidroliz derecesi ile metal şelatlama aktivitesi arasında negatif bir korelasyon varlığını ortaya koymuştur. Bu sebeple biyoaktif peptit üretimi için önerilen HD değeri genel olarak %15 ve daha altındadır (Abeynayake ve ark, 2022; Elmalimadi ve ark, 2017).

Seçilen proteaz türü ve aktivitesi, E/S oranı, tepkime sıcaklığı, pH ve süre, hidroliz derecesi ile doğrudan ilişkili parametrelerdir (Shu ve ark, 2016). Bu çalışmada hidroliz işlemi, ham enzimin proteaz aktivitesinin en yüksek olduğu (2056 U/mL) sıcaklık ve pH koşullarında (60 °C, pH 9) gerçekleştirilmiştir. Rajendhran ve ark. (2024) *Bacillus subtilis* MTCC 2423 kaynaklı proteaz ile glüten proteininden (%5) hidrolizat üretmiştir (Hidroliz koşulları: 1000 U/mL, 40 °C ve pH 8’de 2 sa). Buna göre araştırmacılar %5 oranında protein kullandıklarında HD’yi en yüksek tespit etmiş (%34,07); protein miktarı %10 ve 15’e artırıldığında ise HD sırasıyla %27,2 ve %14,9’a gerilemiştir (Rajendhran ve ark, 2024). Bu çalışmada SPI ile substrat hazırlanırken tampon çözeltide tamamen çözünebilir olan katı madde miktarı göz önünde bulundurulmuş ve böylece izolatin protein oranı sabit tutulmuştur (%5 a/h). Ancak yeterli düzeyde hidroliz sağlamak için E/S’nin uygun oranda seçilmiş olması da önemlidir (Singh ve ark, 2022). E/S oranı çok yüksek olduğunda enzimde kümelenme (agregasyon) gerçekleşebilmekte, protein substrat difüzyonu inhibe olabilmekte ve sonuç olarak hedeflenen enzimin katalitik bölgelerinin eksik olması nedeniyle enzimatik hidroliz süreci zayıflamaktadır (Noman ve ark, 2018). Bununla birlikte, seçilen hidroliz süresi de kritik olup çok kısa veya çok uzun tutulmamalıdır. Çok uzun süreli tepkime sonucunda proteinlerin aşırı düzeyde parçalanması yapı ve fonksiyonu olumsuz etkilerken, kısa süreli (< 30 dk) hidroliz de proteinlerin yetersiz düzeyde parçalanması ve buna bağlı olarak çok düşük HD değeri ile sonuçlanmaktadır (Rajendhran ve ark, 2024). Bu sebeple bu çalışmada seçilen hidroliz süresi (5 sa) bir ön deneme sonucunda kararlaştırılmıştır. Buna göre 5 saatin sonunda en yüksek düzeyde HD elde edilmiş ve bu süre aşıldığında HD’de anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (data verilmedi). Alahmad ve ark. (2023) benzer şekilde en yüksek HD değerine 6 saatte ulaşmış ve 7. saatin sonunda HD’de anlamlı bir fark tespit etmemiştir.

Bu çalışmada E/S %30’dan %40’a yükseldiğinde HD’nin arttığı, %40’ın üzerinde ise azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Üretilen üç hidrolizatın da % HD değeri hafif/orta düzeyde sınıflandırılabilir olsa da E/S %50 hidrolizatı için HD anlamlı ölçüde daha

düşük tespit edilmiştir (%19,9) ($p<0,05$). Biyoaktif ve teknolojik özelliklerinin geliştirilmesi istenen SPI için HD'nin hafif düzeyde elde edilmesi hedeflenmiş, bu sebeple çalışmanın devamında hidroliz için E/S %50 oranında gerçekleştirilmiştir.

4.4.4. Peptit fraksiyonlarının protein içeriği

Yüzde elli E/S oranında hidroliz sonucu elde edilen siyez protein hidrolizati ultrafiltrasyon sistemi ile molekül ağırlıklarına göre ayrılmış ve $MA \leq 1$ kDa, $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa, $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa ve $MA > 10$ kDa olmak üzere dört farklı peptit fraksiyonu elde edilmiştir. Peptit fraksiyonlarının protein içeriği Leco azot analizatörü ile belirlenmiş ve Tablo 4.4'te verilmiştir. Fraksiyonların protein içeriği %43,4 ile 81,7 arasında olup $MA > 10$ kDa fraksiyonu en yüksek protein içeriğine sahiptir. Siyez protein hidrolizati molekül ağırlıklarına göre ayrıldığında protein içeriğinin değiştiği görülmektedir. Peptit büyüklüğü arttıkça fraksiyonun protein içeriği beklenen şekilde anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.4. Siyez protein izolatu, hidrolizati ve peptit fraksiyonlarının toplam protein içeriği.

	$MA \leq 1$ kDa	$1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa	$5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa	$MA > 10$ kDa	Siyez protein hidrolizati	Siyez protein izolatu
% Protein	$43,4 \pm 0,0^F$	$48,6 \pm 0,1^E$	$65,5 \pm 0,3^C$	$81,7 \pm 0,1^A$	$62,5 \pm 0,0^D$	$67,0 \pm 0,1^B$

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$). (N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

4.4.5. Antioksidan aktivite

4.4.5.1. DPPH giderimi

Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizati (SPH) ve peptit fraksiyonlarının DPPH giderimi için belirlenen IC50 (mg/mL) değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Peptit fraksiyonlarının IC50 değeri 15,0 ile 88,3 mg/mL arasındadır. SPI ve SPH için IC50 sırasıyla 18,7 ve 24,3 mg/mL olarak belirlenmiş olup bu iki değer arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Bu bulgu SPI'nin hidroliz edilmesinin DPPH giderimi üzerinde önemli bir etki yaratmadığını göstermektedir. Ultrafiltrasyon işleminin DPPH giderimi üzerindeki etkisi incelendiğinde, moleküler ağırlığı (MA) görece büyük olan iki peptit fraksiyonunun ($5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ ve $MA > 10 \text{ kDa}$) IC50 değeri SPH ile yakın seviyede tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, daha küçük MA'daki fraksiyonların ($1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ ve $MA \leq 1 \text{ kDa}$) DPPH giderimi ultrafiltrasyon sonucu önemli düzeyde zayıflamıştır. Peptit fraksiyonları kendi

arasında değerlendirildiğinde, MA arttıkça IC50 değerinin anlamlı düzeyde azaldığı, böylece DPPH gideriminin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak, fraksiyonların peptit büyüklüğü ile DPPH giderimi arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan troloks için IC50 değeri anlamlı düzeyde düşük tespit edilmiştir (0,1 mg/mL) ($p<0,05$). Bununla birlikte, karışık peptit fraksiyonları içeren bir enzimatik hidrolizatın pozitif kontrolden daha düşük fizyolojik aktiviteye sahip olması beklenen bir durumdur (Xu ve ark, 2023).

Tablo 4.5. Siyez protein izolatu, hidrolizatı, peptit fraksiyonları ve troloksun DPPH giderimi IC50 değerleri.

	MA $\leq$ 1 kDa	1 kDa < MA $\leq$ 5 kDa	5 kDa < MA $\leq$ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatı	Siyez protein izolatı	Troloks
IC50 (mg/mL)	88,3 $\pm$ 9,6 ^A	67,1 $\pm$ 2,0 ^B	28,1 $\pm$ 1,5 ^C	15,0 $\pm$ 0,3 ^D	24,3 $\pm$ 1,2 CD	18,7 $\pm$ 0,1 CD	0,1 $\pm$ 0,0 E

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$).

DPPH•, enzimlerden etkilenmeyen kararlı bir organik reaktiftir ve elektron bağışlayan bileşiklerle etkileşime girme eğilimindedir. Bir elektron veya hidrojen serbest radikali aldığı ve stabilize olduğunda DPPH•'in absorpsiyon özellikleri kaybolmaktadır. DPPH•, süperoksit (O^{-2}) ve hidroksil ($\bullet OH$) radikallerine kıyasla daha yüksek kararlılıkta bir serbest radikal olup, katkı maddelerinin neden olduğu metal şelasyonu ve enzim inhibisyonu gibi komplikasyonların yaşanmaması sebebiyle bu radikallerden daha avantajlıdır. Bu sebeple serbest radikal temizleme aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılırlar (Ren ve ark, 2021; Tian ve ark, 2023).

Bir protein hidrolizatının radikal süpürücü etkisi çeşitli faktörlere bağlıdır. En belirleyici faktörlerden biri hidroliz işlemi sırasında serbest bırakılan amino asitlerin türüdür. İmidazol halkası bulunduran amino asitler ile hidrofobik amino asitler, oksidatif tepkimelerde proton donörü görevi üstlenmesi sebebiyle güçlü şekilde radikal süpürücü aktivite sergilemektedirler (Vásquez-Villanueva ve ark, 2016). Literatürde ayrıca, peptit büyüklüğünün antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde etkilediği ve daha yüksek antioksidan aktivitenin genellikle daha kısa peptitlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Chen ve ark. (2023) pirinç proteini hidrolizatından elde edilen fraksiyonlar için DPPH IC50 değerini 26,7 ve 39,4 mg/mL arasında bildirmiştir. Çalışmada en iyi DPPH giderimi en küçük MA'ya sahip fraksiyonda gözlenirken (MA < 1 kDa), MA arttıkça (1-10 kDa ve > 10 kDa) DPPH giderim etkinliği azalmıştır.

Çeşitli bitkisel proteinlerin proteolitik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatların DPPH giderimi IC50 değerleri derlenmiş ve Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Bitkisel protein hidrolizatlarının DPPH giderim aktivitesi IC50 değerleri.

Örnek	IC50 (mg/mL)	Kaynak
Biracılık artığı tahıl küspesi	2,47	Bazsefidpar ve ark, 2024
Buğday glütteni hidrolizatı	6,07	Seyedain-Ardabili ve ark, 2023
Buğday tohumu albümini	2,415	Tian ve ark, 2023
Buğday tohumu protein hidrolizatı	1,56	Liu ve ark, 2021
Şakayık tohumu proteini	0,18	Wang ve ark, 2021
Buğday tohumu protein hidrolizatı	1,56	Karami ve ark, 2019

Çalışmalar, hidroliz için seçilen enzim türünün proteinlerden antioksidan peptitlerin salınmasında çok etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Ek olarak, sıcaklık ve pH dahil olmak üzere hidroliz işleminin fizikokimyasal koşulları enzimin fonksiyonunu ve sonuç olarak antioksidan özelliklere sahip hidrolizat üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Hidroliz süresi, hidroliz derecesini etkileyerek elde edilen peptitlerin boyutunu, amino asit bileşimini ve dizisini etkilemekte, buna bağlı olarak ürünlerin biyoaktif özellikleri değişmektedir. Yeterli düzeyde hidroliz, daha hidrofobik ve aktif peptitlerin salınmasını için önemlidir. Hidroliz derecesinin artması ile radikallerle daha çok temas sağlayan bir yapı oluşumunun desteklendiği bildirilmektedir (Chalamaiah ve ark, 2015; Hu ve ark, 2020; Seyedain-Ardabili ve ark, 2023; Sotoudeh ve Azizi, 2024; Xu ve ark, 2023).

Araştırmacılar genellikle nispeten yüksek molekül ağırlığına sahip hidrolizatların daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve gıda kökenli çoğu antioksidan peptidin molekül ağırlığının 500 ile 1500 Da arasında değiştiğini bildirmektedir (Kou ve ark, 2013). Bunun olası sebeplerinden biri olarak, yüksek molekül ağırlıklı hidrolizatlarda aktif grupların gömülü kalması ileri sürülmektedir (Bamdad ve ark, 2011). Literatürde genel olarak bildirilenin aksine bu çalışmada, fraksiyonların molekül ağırlığı arttıkça DPPH giderim aktivitesi artmış ve en yüksek aktiviteye MA > 10 kDa fraksiyonu ile ulaşılmıştır. Arpa glutelin peptitleri için de benzer bulgu rapor edilmiş, MA > 10 kDa fraksiyonu için daha düşük MA’ya sahip fraksiyonlara kıyasla daha yüksek DPPH aktivitesi elde edilmiştir. Araştırmacılar bu davranışı, hidrojen donörü ve doğrudan radikal temizleyicisi olarak davranan hacimli ve aromatik yan zincirlere sahip gluteline özgü hidrofobik grupların oluşumu ile açıklamışlardır (Xia ve ark, 2012; Zhou ve ark, 2012). Bu çalışmada da MA > 10 kDa fraksiyonunda benzer şekilde gözlenen yüksek

DPPH giderimi, bu fraksiyondaki hidrofobik grup sayısının daha fazla olduğuna işaret etmektedir.

Protein hidrolizatlarında bulunan asidik amino asitlerin (Glu ve Asp), fazla elektron sağlayarak serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize edebildiği bilinmektedir (Zou ve ark, 2016). Ayrıca, hidrofobik amino asitlerin varlığı genellikle yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesiyle yakından ilişkilidir (Girgih ve ark, 2013, 2015). Bu çalışmada, MA > 10 kDa fraksiyonunun yüksek DPPH giderim kapasitesi Leu ve Phe gibi antioksidan aktiviteye katkıda bulunan hidrofobik amino asit kalıntılarının açığa çıkmış olabileceği ile ilişkilendirilmiştir. Hidrojen veya elektron vericisi olan bu amino asitler ve/veya peptitlerin DPPH serbest radikaliyle tepkimeye girerek bu radikali daha kararlı ürünlere dönüştürdüğü belirlenmiştir (Zhang ve ark, 2023).

4.4.5.2. ABTS giderimi

Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının ABTS giderimi için belirlenen IC₅₀ (mg/mL) değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Peptit fraksiyonlarının IC₅₀ değeri 3,9 ile 4,5 mg/mL arasındadır. SPI ve SPH için IC₅₀ sırasıyla 3,6 ve 4,3 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Siyez protein izolatu, hidrolizatu, peptit fraksiyonları ve troloksun ABTS giderimi IC₅₀ değerleri.

	MA ≤ 1 kDa	1 kDa < MA ≤ 5 kDa	5 kDa < MA ≤ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu	Troloks
IC ₅₀ (mg/mL)	4,3 ± 0,2 AB	4,5 ± 0,1 A	4,0 ± 0,2 BC	3,9 ± 0,3 BC	4,3 ± 0,0 AB	3,6 ± 0,1 C	0,5 ± 0,0 D

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3).

ABTS suda çözünen serbest bir radikaldır ve ABTS giderim aktivitesi serbest radikalın söndürülmesinde görevli polar yapıdaki amino asit miktarına bağlıdır (Phongthai ve ark, 2018). SPH’nın ABTS giderimi SPI’ye kıyasla önemli düzeyde azalmış (p<0,05), bu durum hidroliz sonucu açığa çıkan serbest hidrofobik amino asit kalıntılarının sayısının fazla olması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, SPH ile dört peptit fraksiyonunun IC₅₀ değeri arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (p>0,05). Bu durum ultrafiltrasyon işlemi sonucu elde edilen fraksiyonların ABTS gideriminin benzer düzeyde olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, DPPH giderim aktivitesi sonuçlarına benzer şekilde, dört fraksiyon arasında MA > 10 kDa fraksiyonunun

ABTS serbest radikalini yakalama yeteneği daha fazladır ($p>0,05$). Bu bulgu, pirinç proteini hidrolizatı için yayınlanan araştırma sonuçlarıyla uyumludur (Chen ve ark, 2023).

ABTS için elde edilen IC₅₀ değęlerinin DPPH değęlerinden daha düşük, dolayısıyla ABTS giderim etkinliğinin daha yüksek olduğu görölmektedir. Gözlemlenen bu farklılık, tepkime ortamındaki radikallerin çözünürlüğu ve yayılma gücündeki farkla açıklanabilmektedir. ABTS^{•+} radikali organik ve sulu çözeltilerde çözünebilirken, DPPH yalnızca organik ortamda çözünebilmektedir. Bu sebeple ABTS yöntemi ile ortamın pH değęrine bağlı olmaksızın hidrofilik ve hidrofobik antioksidanların kapasitesi aynı anda belirlenebilmektedir (Barba ve ark, 2013).

Bu çalışmada ABTS gideriminin DPPH'ten daha yüksek olması, ortamdaki ABTS radikalini inhibe edecek çözünebilir amino asit kalıntılarının daha fazla olmasıyla açıklanmıştır (Cotabarren ve ark, 2019; Mirzaei ve ark, 2018; Seyedain-Ardabili ve ark, 2023). Bazsefidpar ve ark. (2024) da ABTS giderimi için benzer sonuç elde etmiş ve bu olguyu hidrofilik ABTS^{•+} radikallerinin hidrofobik proteinlerle bağlanma yeteneğiyle ilişkilendirmiştir (do Evangelho ve ark, 2017).

Çeşitli bitkisel proteinlerin proteolitik hidroliz sonrası ABTS giderimi belirlenmiş ve IC₅₀ değęleri buğday glütenu için sırasıyla 2,47 ve 0,43 mg/mL (Bozkurt ve ark, 2021; Seyedain-Ardabili ve ark, 2023); biracılık artığı tahıl küspesi için 1,7 mg/mL (Bazsefidpar ve ark, 2024); kinoa için 0,8-2,8 mg/mL (Abbasi ve ark, 2022) ve buğday tohumu proteini için 1,44 mg/mL (Karami ve ark, 2019) olarak bildirilmiştir. Genel olarak çalışma bulguları siyez hidrolizatlarının ABTS giderim etkinliğinin kabul edilebilir düzeyde iyi olduğu göstermiştir.

4.4.5.3. Demir (II) iyonu şelatlama

Protein hidrolizatları ve peptitler, yaygın olarak geçiş metal iyonlarını şelatlama ve serbest radikalleri temizleme potansiyeline sahip yapılardır (Su ve ark, 2018). Bu çalışmada, hidrolizatların şelat oluşturma özelliği, ferrozin ve Fe⁺² iyonu kompleksinin oluşumunun izlenmesiyle değęlendirilmiştir. Buna göre siyez protein hidrolizatı (SPH) ve peptit fraksiyonlarının demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi için belirlenen IC₅₀ (mg/mL) değęleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Peptit fraksiyonlarının IC₅₀ değęi 0,17 ile 0,34 mg/mL arasında olup SPH için 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8. Siyez protein izolatu, hidrolizatu, peptit fraksiyonları ve EDTA'nın demir (II) iyonu şelatlama IC50 değerleri.

	MA ≤ 1 kDa	1 kDa < MA ≤ 5 kDa	5 kDa < MA ≤ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu	EDTA
IC50 (mg/mL)	0,17 ± 0,01 ^C	0,20 ± 0,01 ^C	0,26 ± 0,05 ^{BC}	0,34 ± 0,01 ^B	0,50 ± 0,07 ^A	TE	0,02 ± 0,00 ^D

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). (TE: Şelatlama aktivitesi tespit edilmemiştir.)

Peptit fraksiyonlarının IC50 değeri hidrolizatın değerinden anlamlı ölçüde düşük tespit edilmiştir (p<0,05). Bu durum ultrafiltrasyon uygulaması sonucunda metal şelatlama kapasitesinin arttığını göstermektedir. En iyi şelatlama aktivitesini görece küçük boyutta olan MA ≤ 1 kDa ve 1 kDa < MA ≤ 5 kDa fraksiyonları göstermiş; ancak bu iki fraksiyonun aktivitesi arasında istatistiki olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Peptit büyüklüğü arttıkça (MA > 5 kDa) şelatlama kapasitesi azalmış ve 5 kDa < MA ≤ 10 kDa ve MA > 10 kDa fraksiyonları arasında benzer düzeyde görece düşük aktivite tespit edilmiştir (p>0,05).

Demir (II) iyonu, tahrip edici hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açan süperoksitleri meydana getiren Haber-Weiss tepkimesine aktif olarak katılan bir iyondur. Bu nedenle, demir (II) iyonunun şelatlanması, tepkimeye katılacak iyon miktarını azaltıp hasar verici hidroksil radikallerinin oluşumunu engellemesi sebebiyle önemlidir (Famuwagun ve ark, 2021; Xie ve ark, 2008). Çalışmalar proteaz türü, demir(III) klorür/peptit kütle oranının, peptit konsantrasyonunun ve pH'ın şelat oluşturma aktivitesi üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu bildirmektedir (Fan ve ark, 2023). Ayrıca, peptitlerin moleküler ağırlığı da demir bağlama kapasitesini belirlemede önemli bir faktör olup düşük molekül ağırlıklı peptitlerin demire bağlanma eğilimi daha fazladır (Athira ve ark, 2021; Xia ve ark, 2012). Fan ve ark. (2023) tarafından yapılan araştırmada küçük boyutlu peptit fraksiyonu (MA < 3 kDa) hidrolizata kıyasla daha yüksek şelatlama aktivitesi göstermiş olup bulgular bu çalışmayı desteklemektedir.

Hayvansal ve bitkisel kaynaklı çeşitli proteinlerin hidroliz sonrası demir (II) iyonu şelatlama aktivitesi analiz edilmiş ve hidrolizatların IC50 değerleri belirlenmiştir. Buna göre IC50 değerleri buğday gluteni için 6,07 mg/mL (Seyedain-Ardabili ve ark, 2023); siyah fasulye proteini için 0,07 mg/mL (Chen ve ark, 2022); adzuki fasulyesi tohumu için 2,52 mg/mL (Durak ve ark, 2013); mürekkep balığı kas proteini için 0,67 mg/mL (Hmidet ve ark, 2011) ve kenevir (*Cannabis sativa* L.) proteini için 1,6 mg/mL

(Tang ve ark, 2009) olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmaya ait bulgular literatür ile kıyaslandığında, elde edilen fraksiyonların genel olarak çok iyi şelatlama özelliğine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Bir hidrolizatın şelatlama özelliği ayrıca hidroliz sonrası ortaya çıkan aspartik asit ve glutamik asit gibi asidik; veya arjinin, lisin ve histidin gibi bazik amino asit kalıntılarının varlığından da olumlu etkilenebilmektedir (Esfandi ve ark, 2019; Karami ve ark, 2019). Bu çalışmada hidroliz ile aspartik asit ve glutamik asit gibi yüklü grupların açığa çıkmış olabileceği ve böylece hidrolizatların demir iyonlarının bağlanmasına katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir (Phongthai ve ark, 2018). $MA \leq 1$ kDa ve $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ fraksiyonları için gözlemlenen yüksek şelat oluşturma kapasitesi, histidin gibi hidrofilik amino asitlerin yüksek miktarda bulunmasına bağlı olarak geçiş metallerinin hapsedilmiş olmasına atfedilmiştir (Zaky ve ark, 2019).

4.4.5.4. Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç

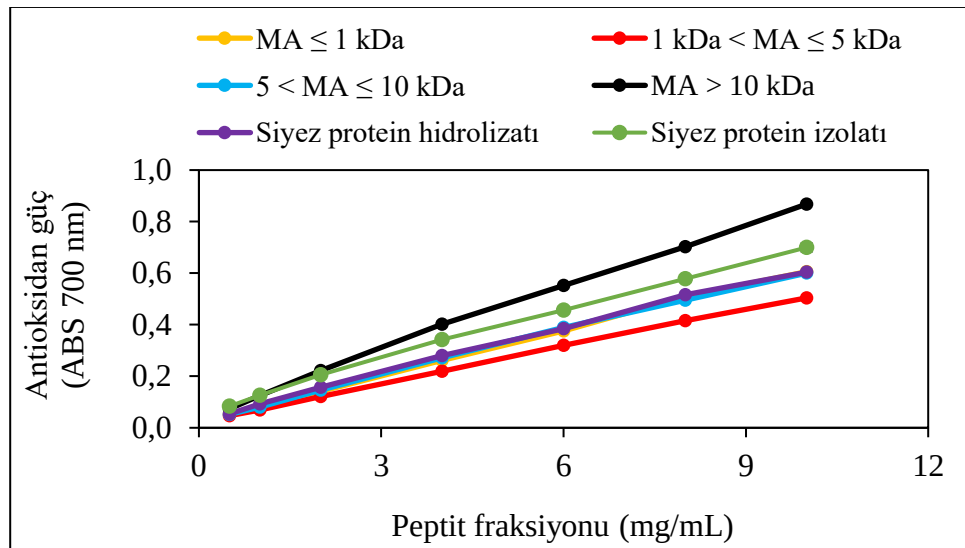
Bu çalışmada demir iyonu indirgeyici antioksidan güç, elektron veya hidrojen verici peptitlerin varlığında ferrisiyanür komplekslerinin (Fe^{+3}) feröz iyonuna (Fe^{+2}) dönüşümünün ölçülmesiyle belirlenmiştir. 700 nm'de yüksek absorbans sergileyen antioksidan türlerinin genellikle daha büyük indirgeyici güce sahip olduğu düşünülmektedir (Ikram ve ark, 2020). Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatı (SPH) ve peptit fraksiyonlarının değişen konsantrasyonları (0,5-10 mg) için elde edilen demir iyonu indirgeyici antioksidan güç değerleri mg askorbik asit eş değeri (AAE) olarak Tablo 4.9'da verilmiştir. Analiz edilen tüm örnekler incelendiğinde, hepsinde 700 nm'deki abs değerinin örnek konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 4.13). SPI'nin antioksidan gücü test edilen tüm konsantrasyonlar için SPH'tan daha yüksek tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu durum, hidroliz işleminin antioksidan gücün azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, hidrolizatın ultrafiltrasyon işlemi ile MA fraksiyonlarına ayrılması antioksidan gücü değiştirmiş, özellikle $MA > 10$ kDa fraksiyonunda antioksidan güç test edilen tüm konsantrasyonlar için önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$). Moleküler ağırlığı 10 kDa'dan küçük olan peptitler için membranla ayırma işlemi antioksidan güç üzerinde önemli bir etki yaratmamıştır. $MA > 10$ kDa fraksiyonunun antioksidan gücü DPPH ve ABTS^{o+} radikallerinin giderimiyle benzer şekilde en yüksek tespit edilmiştir. Bu bulgu, Olagunju ve ark. (2018) tarafından rapor edilen ve yüksek MA'lı peptitlerin (> 10 kDa) düşük MA'lı peptitlerden (< 5 kDa) daha iyi FRAP sergilediğini belirten

çalışma ile uyum göstermiştir. Ayrıca, Phongthai ve ark. (2018), bir peptidin içeriğinde Tyr ve Trp bulunması ile elektron bağışlayan veya indirgeyen daha fazla amino asidin yer alması ve bunun sonucunda daha iyi antioksidan güce işaret etmektedir. Bu sebeple bu SPH MA > 10 kDa fraksiyonunun Tyr ve Trp amino asitlerince zengin olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4.9. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının demir iyonu indirgeyici antioksidan güç değerleri.

Örnek miktarı (mg/mL)	İndirgeyici güç (μg askorbik asit eş değeri/mL)					
	MA $\leq$ 1 kDa	1 kDa < MA $\leq$ 5 kDa	5 kDa < MA $\leq$ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
0,5	2,5 $\pm$ 0,1 ^{Cg}	2,2 $\pm$ 0,1 ^{Cg}	2,4 $\pm$ 0,2 ^{Cg}	3,3 $\pm$ 0,2 ^{Bg}	2,5 $\pm$ 0,1 ^{Cg}	3,8 $\pm$ 0,1 ^{Ag}
1	3,6 $\pm$ 0,2 ^{Cf}	3,2 $\pm$ 0,1 ^{Df}	3,6 $\pm$ 0,1 ^{Cf}	5,6 $\pm$ 0,1 ^{Af}	4,2 $\pm$ 0,2 ^{Bf}	5,6 $\pm$ 0,2 ^{Af}
2	6,3 $\pm$ 0,2 ^{De}	5,4 $\pm$ 0,2 ^{Ee}	6,5 $\pm$ 0,1 ^{CDe}	9,8 $\pm$ 0,4 ^{Ae}	7,0 $\pm$ 0,3 ^{Ce}	9,1 $\pm$ 0,1 ^{Be}
4	11,5 $\pm$ 0,3 ^{Dd}	9,7 $\pm$ 0,3 ^{Ed}	11,9 $\pm$ 0,1 ^{CDd}	17,6 $\pm$ 0,1 ^{Ad}	12,3 $\pm$ 0,2 ^{Cd}	15,0 $\pm$ 0,4 ^{Bd}
6	16,5 $\pm$ 0,0 ^{Cc}	14,0 $\pm$ 0,3 ^{Dc}	17,1 $\pm$ 0,4 ^{Cc}	24,2 $\pm$ 0,8 ^{Ac}	16,9 $\pm$ 0,2 ^{Cc}	20,0 $\pm$ 0,3 ^{Bc}
8	22,3 $\pm$ 0,2 ^{Cb}	18,2 $\pm$ 0,4 ^{Db}	21,7 $\pm$ 0,4 ^{Cb}	30,7 $\pm$ 0,5 ^{Ab}	22,6 $\pm$ 0,3 ^{Cb}	25,3 $\pm$ 0,4 ^{Bb}
10	26,5 $\pm$ 0,4 ^{Ca}	22,1 $\pm$ 0,7 ^{Da}	26,2 $\pm$ 0,2 ^{Ca}	37,9 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	26,4 $\pm$ 1,0 ^{Ca}	30,6 $\pm$ 0,7 ^{Ba}

*Küçük harfler aynı sütundaki, büyük harfler aynı satırdaki ortalamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).



Şekil 4.13. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının antioksidan güç grafiği.

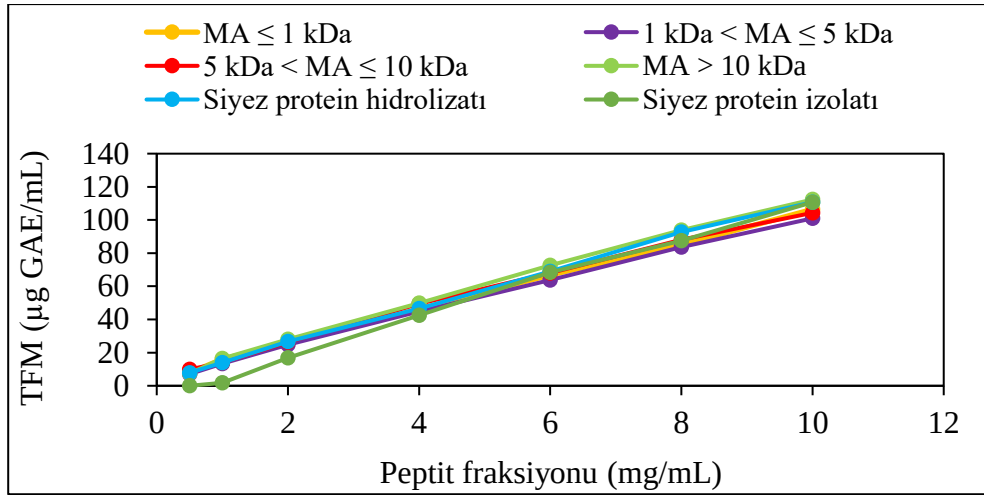
4.4.5.5. Toplam fenolik madde

Toplam fenolik madde içeriği, aromatik amino asitler, tiyol içeren aromatik amino asitler, peptitler ve fenolik bileşikler dahil olmak üzere çeşitli antioksidan bileşiklerle tepkimeye giren Folin-Ciocalteu reaktifinin kullandığı yöntem ile belirlenmiştir (Everette ve ark, 2010). Buna göre siyez protein izolatu (SPİ), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının değişen konsantrasyonları (0,5-10 mg) için elde edilen toplam fenolik madde (TFM) miktarı mg gallik asit eş değeri (GAE) olarak Tablo 4.10'da verilmiştir. Analiz edilen tüm örneklerin TFM içeriği örnek konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 4.14). SPH'nin TFM miktarı genel olarak aynı konsantrasyona karşılık gelen SPİ'ye kıyasla daha fazla tespit edilmiştir. ($p<0,05$). TFM'deki bu artış, kovalent bağ ve hidrofobik, iyonik, hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağlar aracılığıyla proteinle etkileşim halinde olan fenolik bileşiklerin ve Tyr ve Phe gibi fenol gruplarına sahip peptitlerin hidroliz sonucunda serbest kalmasına atfedilmiştir (Thamnarathip ve ark, 2016). Fraksiyonlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde, peptit büyüklüğüne bağlı olarak TFM içeriğinde anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.10. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriği.

Örnek miktarı (mg/mL)	Toplam fenolik madde (μ g gallik asit eş değeri/mL)					
	MA $\leq$ 1 kDa	1 kDa < MA $\leq$ 5 kDa	5 kDa < MA $\leq$ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
0,5	7,7 $\pm$ 0,3 ^{Bg}	7,0 $\pm$ 0,0 ^{Bg}	9,9 $\pm$ 0,7 ^{Ag}	7,4 $\pm$ 0,1 ^{Bg}	7,8 $\pm$ 0,3 ^{Bg}	0,0 $\pm$ 0,1 ^{Cf}
1	16,0 $\pm$ 0,9 ^{Af}	13,4 $\pm$ 0,2 ^{Bf}	13,9 $\pm$ 0,3 ^{Bf}	16,5 $\pm$ 1,4 ^{Af}	13,9 $\pm$ 0,1 ^{Bf}	1,8 $\pm$ 0,1 ^{Cf}
2	25,9 $\pm$ 0,9 ^{BCe}	24,7 $\pm$ 0,2 ^{Ce}	26,3 $\pm$ 1,3 ^{ABCe}	28,0 $\pm$ 0,1 ^{Ae}	26,8 $\pm$ 0,0 ^{ABe}	16,8 $\pm$ 0,7 ^{De}
4	46,1 $\pm$ 0,2 ^{BCDd}	44,9 $\pm$ 0,5 ^{CDd}	49,5 $\pm$ 2,8 ^{ABd}	49,9 $\pm$ 0,9 ^{Ad}	46,5 $\pm$ 0,0 ^{ABCd}	42,5 $\pm$ 1,1 ^{Dd}
6	66,8 $\pm$ 0,4 ^{Cc}	63,8 $\pm$ 0,3 ^{Dc}	68,0 $\pm$ 0,9 ^{BCc}	72,7 $\pm$ 0,3 ^{Ac}	69,1 $\pm$ 0,1 ^{Bc}	68,3 $\pm$ 0,8 ^{BCc}
8	85,0 $\pm$ 1,7 ^{BCb}	83,6 $\pm$ 0,6 ^{Cb}	88,0 $\pm$ 2,5 ^{Bb}	93,9 $\pm$ 0,9 ^{Ab}	92,7 $\pm$ 1,4 ^{Ab}	87,6 $\pm$ 1,2 ^{BCb}
10	106,4 $\pm$ 1,5 ^{ABCa}	101,0 $\pm$ 3,2 ^{Ca}	104,3 $\pm$ 3,3 ^{BCa}	112,3 $\pm$ 3,5 ^{Aa}	110,7 $\pm$ 0,7 ^{ABa}	110,7 $\pm$ 1,7 ^{ABa}

*Küçük harfler aynı sütundaki, büyük harfler aynı satırdaki ortalamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$).



Şekil 4.14. Siyez protein izolatu, hidrolizatı ve peptit fraksiyonlarının TFM grafiği.

Fenolik asitler çoğunlukla proteinlere bağlı bileşikler olarak ortaya çıkmaktadır. Fenolik bileşiklerin bitkisel proteinlerle etkileşimleri sonucu çözünür veya çözünmeyen formda kompleksler oluşturduğu ve bu nedenle organizmada çok düşük biyoyararlanıma neden olduğu bilinmektedir (Wang ve ark, 2014). Bununla birlikte, enzimatik hidroliz sonucu polifenol-protein örüntüsü büyük ölçüde değişmektedir. Proteinlere bağlı polifenollerin bazıları serbest ve çözünür polifenollere dönüşmekte ve böylece antioksidan özellikler gelişmektedir (Hernández-Jabalera ve ark, 2015; Liu ve ark, 2017; Oboh ve ark, 2009). Bu çalışmada, literatürle uyumlu şekilde TFM içeriği hidroliz sonucu artmış, bu durum fitokimyasal bileşiklerin serbest hale geçmiş olması ile ilişkilendirilmiştir.

TFM içeriği benzer seviyede tespit edilen peptit fraksiyonlarının diğer antioksidan aktivite bulguları farklılık göstermiş ve farklı büyüklükteki MA fraksiyonları için serbest radikalleri inhibe edici etkinliğin değiştiği belirlenmiştir. Peptit fraksiyonlarının antioksidan kapasitesindeki bu farklılık, içeriğindeki fenolik bileşik miktarına bağlı olmaksızın peptit büyüklüğü, konformasyonu, hidrofobisite, çözünürlük, amino asit kompozisyonu ve iyonik yük gibi fizikokimyasal özelliklerine atfedilmiştir. Sonuç olarak, SPİ’de peptitler ve polifenoller arasındaki potansiyel sinerjistik etkileşim veya fenolik gruplara sahip peptitlerin bulunması sonucu belirlenen antioksidan özellikler hidroliz ile iyileştirilmiş ve buna bağlı artan TFM ile hidrolizatın biyoyararlayış özellikleri geliştirilmiştir (Noptana ve ark, 2024).

4.4.6. α -Amilaz inhibitör aktivite

Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının α -amilaz inhibitör aktivitesi μg akarboz eş değeri (AE)/mg örnek olarak Tablo 4.11’de verilmiştir. Peptit fraksiyonlarının inhibitör aktivitesi 2,3-3,6 μg AE/mg arasında belirlenmiştir. $\text{MA} \leq 1$ kDa fraksiyonunun inhibitör aktivitesi dört fraksiyon arasında en yüksek tespit edilmiş; buna karşın peptit büyüklüğü ile aktivite arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. SPI ve SPH için aktivite değerleri sırasıyla 2,6 ve 2,4 μg AE/mg’dır. İki değer arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamış, böylece hidroliz işleminin α -amilaz inhibitör aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.11. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının α -amilaz inhibitör aktivitesi.

	$\text{MA} \leq 1$ kDa	$1 \text{ kDa} < \text{MA} \leq 5$ kDa	$5 \text{ kDa} < \text{MA} \leq 10$ kDa	$\text{MA} > 10$ kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
α -amilaz inhibitör aktivitesi (μg AE/mg)	$3,6 \pm 0,2$ A	$2,5 \pm 0,0$ BC	$2,3 \pm 0,1$ C	$2,5 \pm 0,1$ B	$2,4 \pm 0,0$ BC	$2,6 \pm 0,0$ B

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).

α -amilaz, diyet nişastanın sindiriminde yer alan temel enzimlerdendir. Oligosakkaritleri açığa çıkarmakta ve oligosakkaritler vücutta hızlıca emilen glukoz monomerlerine parçalanmaktadır. Bu bağlamda α -amilaz aktivitesinin inhibisyonu diyabetin kontrol altına alınması açısından önemlidir (Gropper ve Smith, 2013). Bir peptidin antidiyabetik özellikleri, peptit boyutu ve dizisi ile peptit zincirindeki hidrofobik amino asitlerin varlığı ile ilişkilidir (Ngoh ve Gan, 2016). Bir çalışmada, pirinç kepeği protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibitör aktivitesi 6,9 ile 56,1 μg AE/mg protein olarak bildirilmiştir. Pirinç kepeğinin inhibitör aktivitesi bu çalışmada siyez peptitleri ($\text{MA} \leq 1$ kDa) için belirlenen en yüksek aktivite değerinin yaklaşık 2-15 katıdır (Uraipong ve Zhao, 2016). Bezelye proteininin proteolitik hidrolizatu (1-3 kDa) ile yapılan bir araştırmada en yüksek inhibitör aktivite 225 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu için %30,52 oranında (Awosika ve Aluko, 2019) ve pinto fasulyesi peptit fraksiyonu için (500 $\mu\text{g/mL}$) %62 oranında (Ngoh ve Gan, 2016) elde edilmiştir. Bu çalışmada $\text{MA} \leq 1$ kDa fraksiyonunun 10 mg/mL konsantrasyonu için inhibitör aktivite $\%18,8 \pm 0,8$ ’dir (data verilmedi). Çia protein hidrolizatından elde edilen 1-

3 kDa fraksiyonunun 10 mg/mL'ı için inhibitör aktivite bu çalışmaya benzer seviyede belirlenmiş ve zayıf inhibisyon özelliğinde değerlendirilmiştir (%18) (Crespo, 2018).

Çalışmalar α -amilaz inhibitör etkinin esas olarak bitki özleri ve protein içermeyen diğer bileşikler için gözlemlendiğini bildirmektedir (Bashary ve ark, 2020; Sales ve ark, 2012). Bununla birlikte yulaf (Fuentes ve ark, 2021), kinoa (Zhou ve ark, 2023a), pirinç (Uraipong ve Zhao, 2016), soya fasulyesi (González-Montoya ve ark, 2018) ve buğday (Bozkurt ve ark, 2021) bitkileri enzimatik hidroliz yoluyla α -amilaz inhibitörü peptit üretiminde potansiyel kaynaklardır. Yapılan araştırmalar, α -amilaz inhibisyonuna yol açan peptit dizilerinin ortak noktasının yapıda özellikle Leu ve Pro olmak üzere hidrofobik aminoasitlerin bulunması olduğunu göstermektedir (Bozkurt ve ark, 2021). Bu bağlamda siyez proteinlerinin zayıf antidiyabetik karakteri, Leu ve Pro içeriğinin yetersiz olması ile ilişkili olabilir. Sonuç olarak, siyez proteinleri seçilen hidroliz koşullarında α -amilaz inhibitörü peptit üretimi için potansiyel taşımadığı ve antidiyabetik özellikleri açısından zayıf/yetersiz yönünde değerlendirilmiştir.

4.4.7. Teknolojik özellikler

4.4.7.1. Emülsifiye edici özellikler

Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının emülsifiye edici özellikleri emülsiyon aktivite indeksi (EAI, m^2/g) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.12'de verilmiştir. Buna göre peptit fraksiyonlarının EAI değeri 5,3 ile 29,3 m^2/g arasında belirlenmiştir. SPH'nin aktivite indeksi (14,4 m^2/g) SPI'den (22,4 m^2/g) anlamlı düzeyde düşük elde edilmiş ($p < 0,05$), bu bulgu hidroliz işleminin emülsifiye etme kapasitesi üzerine negatif etkide bulunduğunu göstermiştir. Emülsifiye edici özellikler büyük ölçüde iyonik yüke ve hidrofobisiteye bağlıdır. Yüksek alkali pH'ta peptit zincirlerinin açılması sonucu hidrofobik amino asitlerin açığa çıkması ve amino asitlerin emülsiyon arayüzünde hızlı difüzyonu sayesinde emülsiyon özellikleri iyileşmektedir (Jiang ve ark, 2009; Zhang ve ark, 2009; Zheng ve ark, 2020). Bu bağlamda SPI'nin hidrofobik amino asit içeriğinin SPH'nin içeriğinden daha fazla olma ihtimali söz konusudur. Bununla birlikte Yang ve ark. (2023) buğday proteininin enzimatik hidrolizatu için EAI değerini 0,37 m^2/g olarak bildirmiş, bu çalışmada SPH için aktivite çok daha yüksek gözlenmiştir.

Peptit büyüklüğü genel olarak emülsifiye etme aktivitesi üzerinde önemli etki göstermiş ve aktivite peptit MA'sına bağlı artarak MA > 10 kDa fraksiyonu için en yüksek değerine ulaşmıştır (29,3 m²/g). ESI değeri SPI ve SPH için sırasıyla 17,3 ve 15,0 dk olup iki değer arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Bu bulgu hidroliz işleminin protein izolatının emülsiyon stabilitesini değiştirmediğine işaret etmektedir. Hidrolizatın MA'ya göre fraksiyonlarına ayrılması emülsiyon stabilitesini etkilemiş ve genel olarak düşük MA'daki fraksiyonlar için daha yüksek stabilite tespit edilmiştir. Buna göre MA ≤ 1 kDa (27,0 dk) ve 1 kDa < MA ≤ 5 kDa (25,0 dk) fraksiyonları için elde edilen ESI değerleri en yüksek olup bu iki değer arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

Tablo 4.12. Siyez protein izolatı, hidrolizatı ve peptit fraksiyonlarının emülsiyon aktivite ve emülsiyon stabilite indeksi.

	MA ≤ 1 kDa	1 kDa < MA ≤ 5 kDa	5 kDa < MA ≤ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatı	Siyez protein izolatı
EAİ _(0, dk)	5,3 ± 0,3 ^E	8,5 ± 0,7 ^D	7,5 ± 0,4 ^D	29,3 ± 0,4 ^A	14,4 ± 0,8 ^C	22,4 ± 0,4 ^B
EAİ _(10, dk)	3,3 ± 0,3 ^E	4,4 ± 0,1 ^D	2,3 ± 0,2 ^F	11,6 ± 0,2 ^A	5,3 ± 0,2 ^C	8,3 ± 0,5 ^B
ESI	27,0 ± 1,3 ^A	25,0 ± 0,3 ^A	15,2 ± 1,2 ^{BC}	17,8 ± 0,9 ^B	15,0 ± 1,0 ^C	17,3 ± 0,7 ^{BC}

*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). EAİ: Emülsiyon aktivite indeksi (m²/g); ESI: Emülsiyon stabilite indeksi (dk).

Emülsiyon, karışmayan iki sıvıdan oluşan heterojen bir sistemdir. İki sıvının bileşenleri arasında bulunan ara yüzey çekme kuvvetleri nedeniyle bu tür sistemlerin kararlılığı düşüktür. Emülgatörler, emülsiyonlarda yapının kırılmasını/parçalanmasını önleyerek stabiliteyi sağlayan en önemli faktörlerdendir (Tadros, 2009). Bir peptidin emülsifiye etme özelliği, protein zincirlerinin sınırlı şekilde açılması ile ilişkilidir. Açılan zincirler orijinal halleri gibi kümülatif ve karmaşık değildir ve hidrofilik ve hidrofobik gruplar daha dengeli bir konumdadır. Bu grupların su ve yağ arasındaki yüzeye yerleşmesi sonucu emülsifiye etme kapasitesi artmakta, bu sırada protein zincirinin uzaysal yapısı kısmen açılmakta ve bazı bağlar kaybolmaktadır. Hidroliz fazla gerçekleştiğinde oluşan kısa zincirli peptitlerin miktarı artacak ve bu peptitler kısa oldukları için yağ damlacıkları etrafında daha az kararlı protein tabakaları oluşturacaktır. Kısa peptitler hızlı şekilde hareket edebildikleri için iki faz arasındaki arayüzde kolayca absorbe olmaktadır. Ancak kısa peptitler arayüz gerilimini azaltmada uzun peptitler kadar etkin değildirler. Bu sebeple kısa peptitlerin emülsifiye

edici özellikleri zayıftır. Daha büyük peptitler arayüzde açılabilme ve yeniden konumlanabilme özellikleri sayesinde emülsiyonları daha kararlı hale getirmektedir (Kong ve ark, 2008; Niazi ve Torabizadeh, 2022; Olanca ve Özay, 2010; Wang ve ark, 2006). Görece boyutu küçük ($MA \leq 10$ kDa) fraksiyonlar için gözlenen düşük EAI değerleri bu olguyu desteklemektedir. Buna karşın, çalışmada kısa zincirli peptit fraksiyonlarının stabilitesi daha yüksek tespit edilmiştir. Bu karışıklığın, fraksiyonların hidrofilik ve hidrofobik amino asit gruplarının dağılımındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.4.7.2. Yağ tutma kapasitesi

Yağ tutma kapasitesi (YTK), bir protein matrisi içinde yağı içine çekme ve tutma yeteneğini ifade etmekte ve yağ bağlama kapasitesi ile eşanlamli olarak kullanılmaktadır (Lam ve ark, 2017). Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının yağ tutma kapasitesi (YTK) g yağ/g hidrolizat olarak belirlenmiş ve YTK bulguları Tablo 4.13'te verilmiştir. Buna göre YTK 0,32 ile 9,21 g yağ/g arasındadır. Hidroliz sonucu YTK azalarak 2,79 g/g'dan (SPI) 2,08 g/g'a (SPH) gerilemiş ve ayrıca membran filtrasyon uygulaması YTK'yı genel olarak önemli düzeyde etkilemiştir ($p < 0,05$). Küçük molekül ağırlıklı $MA \leq 1$ kDa ve $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa fraksiyonlarının YTK'si SPH'tan önemli düzeyde daha az olup ($p < 0,05$) bu iki fraksiyonun YTK değerleri arasındaki fark anlamlı değildir ($p > 0,05$). Peptit boyutu arttıkça YTK da artmış ve $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa fraksiyonu ile SPH için benzer seviyede yağ absorpsiyonu gözlenmiştir ($p > 0,05$). Bununla birlikte, $MA > 10$ kDa fraksiyonu ile en yüksek YTK değerine ulaşılmıştır (9,21 g/g).

Tablo 4.13. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının yağ tutma kapasitesi.

	$MA \leq 1$ kDa	$1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa	$5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa	$MA > 10$ kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
Yağ tutma kapasitesi (g yağ/g örnek)	$0,54 \pm 0,06$ D	$0,32 \pm 0,10$ D	$1,84 \pm 0,13$ C	$9,21 \pm 0,59$ A	$2,08 \pm 0,03$ C	$2,79 \pm 0,07$ B

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) ($n=3$).

Deng ve ark. (2016) buğday glütenini *Aspergillus usamii* fungal proteazıyla hidroliz etmiş ve yağ tutma kapasitesinin 2,91 g/g'a yükseldiğini bildirmiştir. Bakla fasulyesinden pepsin ile protein hidrolizatu üretilen bir çalışmada YTK bu çalışmadan

daha yüksek (8,21 g/g) tespit edilmiş; ancak bu çalışmaya uyumlu şekilde ultrafiltrasyon işleminin (MA > 10 kDa ve MA: 5-10 kDa fraksiyonları için) yağ tutma kapasitesini arttırdığı bildirilmiştir (Eckert ve ark, 2019). Siyez peptit fraksiyonu (MA > 10 kDa) için belirlenen yüksek YTK ile (9,21 g/g) bu fraksiyonun yağ absorpsiyonunda güçlü potansiyeli ortaya konmuştur. Peptitlerin yağ tutucu özelliği, protein yapısı içinde gömülü, polar olmayan yan zincirlerin hidroliz ile açığa çıkarak yağın hidrokarbon kısımlarını bağlaması esasına dayanmaktadır (Ling ve ark, 2019). Protein yapısının açılması ile daha fazla fonksiyonel grup yağın hidrokarbon kısımlarına hidrofobik, elektrostatik veya hidrojen bağları yoluyla bağlanabilmektedir (Soria-Hernández ve ark, 2015). Böylece yağın fiziksel olarak hapsedilmesi kolaylaşmakta ve yağ tutma kapasitesi artmaktadır (Bao ve ark, 2017). Bu bağlamda, MA > 10 kDa fraksiyonunun yüksek protein içeriğinin yanı sıra güçlü hidrofobik yapısının YTK üzerinde olumlu etki yarattığı düşünülmektedir.

4.4.7.3. Köpürme özellikleri

Köpürme özellikleri, yumuşak bir doku oluşumuna ve ağızdaki hisse katkıda bulunduğu için gıda işleme alanında önemli bir rol oynamaktadır (Zielińska ve ark, 2018). Köpük, bir sıvı içinde dağılmış havadan oluşan termodinamik olarak kararsız bir yapıdır (Du ve ark, 2022). Köpük oluşturma performansını değerlendirmek için genellikle köpük genleşmesi ve köpük stabilitesi ifadeleri kullanılmaktadır. Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının köpük genleşmesi ve köpük stabilitesi % olarak belirlenmiş ve bulgular Tablo 4.14'te verilmiştir. Peptit fraksiyonlarının köpük genleşmesi %11 ile 77 arasında, köpük stabilitesi %1 ile 87 arasındır. SPI ve SPH'nin köpük genleşmesi sırasıyla %30 ve %49; köpük stabilitesi %75 ve %80'dir. MA ≤ 1 kDa fraksiyonu için herhangi bir köpük oluşumu gözlenmemiştir. Hidroliz işlemi köpük genleşmesini büyük oranda artırırken ($p < 0,05$), köpük stabilitesinde anlamlı bir değişime sebep olmamıştır ($p > 0,05$). Membran filtrasyon sistemi ile MA'larına göre ayrılan fraksiyonlar için peptit büyüklüğü arttıkça köpürme özelliklerinin geliştiği belirlenmiştir. Buna göre MA > 10 kDa fraksiyonu için büyük oranda genleşme (%77) ve stabilite (%87) gözlenmiştir.

Tablo 4.14. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının köpük genleşmesi ve stabilitesi.

	MA ≤ 1 kDa	1 kDa < MA ≤ 5 kDa	5 kDa < MA ≤ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
Köpük genleşmesi (%)	TE	11 ± 1 ^D	31 ± 4 ^C	77 ± 11 ^A	49 ± 3 ^B	30 ± 3 ^C
Köpük stabilitesi (%)	TE	6 ± 1 ^B	1 ± 1 ^B	87 ± 6 ^A	80 ± 7 ^A	75 ± 12 ^A

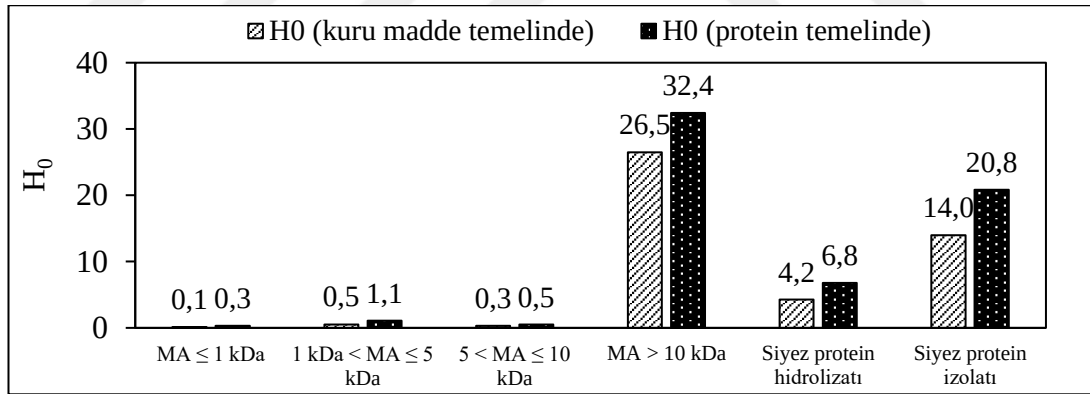
*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3). (TE: Köpük genleşmesi ve stabilitesi tespit edilmemiştir.)

Köpük oluşumu, diğer bir ifade ile köpük oluşturma kapasitesi, yüksek yüzey aktivitesine sahip proteinlerin hava-su arayüzünde hızlı taşınım, absorpsiyon ve yeniden düzenlenme konusundaki gelişmiş yeteneklerine bağlıdır. Çözünebilir proteinler, hava-su arayüzünün yüzey gerilimini azaltarak kabarcıkların birbirine bağlanmasını önlemektedir. Ayrıca, protein molekülleri açılıp birbirleriyle reaksiyona girerek çok katmanlı bir protein filmi oluşturabilmektedir. Bunun sonucunda hava-su arayüzünde SS/SH değiş-tokuş tepkimeleri tarafından tetiklenen daha esnek bir form oluşmaktadır. Sonuç olarak, kabarcıkları kırmak zorlaşmakta ve katı köpük oluşumu gerçekleşmektedir. Bir hidrolizatın köpürme özellikleri molekül ağırlığı ve peptit uzunluğu ile yakından ilişkilidir. Düşük molekül ağırlıklı peptitler, arayüzeydeki iyi düzenlenmiş moleküler yönelimi korumak için yetersiz olduklarından kısa zincirli peptitlerin köpürme etkinlikleri zayıftır (Halim ve Sarbon, 2020; Mazloomi-Kiyapey ve ark, 2019; Nirmal ve ark, 2022). Zhao ve ark. (2024), buğday gluteni enzimatik hidrolizatının aşırı hidrolizi sonucu oluşan düşük MA'lı kısa peptitlerin köpürme kapasitesinin zayıf olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada düşük MA'lı peptit fraksiyonları için elde edilen bulgular belirtilen bu olgu ile tutarlılık göstermektedir.

Proteinlerin köpükleri stabilize etme kapasitesi genellikle hava-su arayüzünde etkileşime girme ve kohezif bir film oluşturma yeteneklerine bağlıdır. Bu etkileşimlerin doğası değişebilmekle birlikte en yaygın elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Wouters ve ark, 2017). Bu bağlamda proteinlerde prolin ve lizin varlığı, hidrojen bağlarının sayısını ve dolayısıyla protein yük yoğunluğunu artırması sebebiyle köpük stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır (Giménez ve ark, 2009). Bu sebeple köpük stabilitesinin daha iyi olduğu belirlenen MA > 10 kDa fraksiyonu prolin ve/veya lizin amino asitlerince zengin olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

4.4.8. Yüzey hidrofobisite özellikleri

Yüzey hidrofobisitesi (H_0), proteinlerin işlevselliğini ve biyolojik aktivitesini etkileyen önemli bir özelliktir (Wang ve ark, 2022). Hidrofobik güçler proteinlerin üçüncül yapısını oluşturan ana kuvvettir (Ai ve ark, 2019). Bu çalışmada hidrofobisite ANS yöntemi ile belirlenmiştir. ANS, anyonik proteinlerle reaksiyona girme özelliğindeki sülfonik asit gruplarını içeren anyonik bir probtur. Protein veya hidrolizata bağlanarak hidrofobisite düzeyini tespit etmede ekzojen bir floresan işaretleyici görevi görmektedir. Siyez protein izolatu (SPİ), siyez protein hidrolizatu (SPH) ve peptit fraksiyonlarının yüzey hidrofobisitesi hidrofobisite indeksi (H_0) olarak belirlenmiş ve indeks değerleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Buna göre hidrofobisite en yüksek $MA > 10$ kDa fraksiyonu için belirlenmiştir (H_0 : 32,4). Ultrafiltrasyon uygulaması H_0 indeksini önemli ölçüde etkilemiş, moleküler boyutu daha küçük olan peptitler için ($MA \leq 10$ kDa) yüzey hidrofobisitesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. SPİ ve SPH için H_0 sırasıyla 20,8 ve 6,8 olarak belirlenmiştir. Bir araştırmada buğday gluteni proteolitik hidrolizatları için benzer eğilim gözlenmiş, 100 kDa fraksiyonu için H_0 en yüksek tespit edilmiş ve 50 ve 20 kDa için kademeli olarak azalmıştır (Wang ve ark, 2006).



Şekil 4.15. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının yüzey hidrofobisitesi.

Proteinler enzimatik hidroliz ile küçük peptit zincirlerine parçalanırken protein yapısı açılmakta ve içindeki hidrofobik gruplar açığa çıkmakta, böylece yüzey hidrofobisitesi önemli ölçüde artmaktadır. Açığa çıkan farklı molekül ağırlığına sahip polipeptitler farklı agregasyon ve dispersiyon özellikleri göstermektedir. Peptitlerin anyon bölgeleri ne kadar kapsamlı bir şekilde açığa çıkarsa, buna karşılık gelen hidrofobisitenin de o derece güçlü olacağı bildirilmektedir (Alix ve Blanc-Potard, 2009).

Bu çalışmada SPH'nin H_0 değeri SPI'nin yaklaşık 3'te 1'i kadardır. Bu durum enzimatik hidroliz sonucunda siyez proteinlerinin hidrofobik özelliklerinin zayıfladığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, Xu ve ark. (2021) nohut proteini izolatlarının bromelain ile hidrolizi sonucunda yüzey hidrofobisitesinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, pirinç kepeği proteinleri tripsin ile hidroliz edilmiş, hidrolizatın yüzey hidrofobisitesinin önce arttığı ve sonra artan hidroliz derecesiyle H_0 'ın azaldığı rapor edilmiştir (Zang ve ark, 2019). Bu durum, enzimatik hidroliz ile hidrofobik amino asitlerin açığa çıkmış olması; buna karşın hidrolizin ilerlemesiyle hidrofobik amino asitlerin oluşan yeni yapıya yeniden gömülmesi veya hidrofobik etkileşimlerin hidrofobik amino asitlerin kümelenmesine (agregasyonuna) neden olmasından kaynaklanmış olabilir (Wang ve ark, 2022).

Genel olarak hidrofobik amino asit (Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Pro, Met, Cys) içeriği fazla olan peptitlerin yağda çözünürlüğünün artması sebebiyle antioksidan aktivitelerinin yüksek olması beklenmektedir (Xie ve ark, 2019). Çalışma kapsamında, antioksidan aktivite analizlerinde genel olarak $MA > 10$ kDa fraksiyonu ve onu takip eden SPI için yüksek aktivite gözlenmiş, bunun yanı sıra bu iki peptit örneğinin H_0 indeksi benzer bir eğilim göstermiştir. Böylece, gelişmiş antioksidan özelliklere sahip siyez peptitlerin hidrofobik karakteri doğrulanmıştır.

4.4.9. Fizikokimyasal özellikler

4.4.9.1. FTIR spektroskopisi

FTIR spektroskopisi malzemelerin titreşim frekanslarını inceleyerek kimyasal bileşimlerine ilişkin bilgiler sağlayan güçlü bir analitik tekniktir. Siyez protein izolatu (SPI), siyez protein hidrolizatı (SPH) ve peptit fraksiyonlarının $4000-800\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında elde edilen IR spektrumuna ait absorbans pikleri Tablo 4.15'te verilmiştir. Amid I bandı proteinlerin ve polipeptitlerin ikincil (sekonder) yapısını ve konformasyonel değişimleri ölçmek için yaygın olarak kullanılan en hassas bölgedir. Tipik olarak $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında görülen bu bant, öncelikli olarak amid bağının $C=O$ gerilme titreşimleriyle ilişkilidir. Bu bağ doğrudan omurga konformasyonlarıyla ilişkilidir ve her ikincil yapı tipi farklı $C=O$ gerilmesine sahiptir (Jiang ve ark, 2011; Kong ve Yu, 2007; Susi ve Byler, 1983). Amid I bandının kesin konumunun bilinmesi proteinin ikincil yapısının (örneğin α -heliks, β -plaka, rastgele bobin) belirlenmesinde önemlidir. Örneğin $1642, 1638, 1632, 1627$ ve 1624 cm^{-1} bölgesindeki bantlar β -plakayla, 1640 ve 1658 cm^{-1} arasındaki bantlar α -heliksle ve

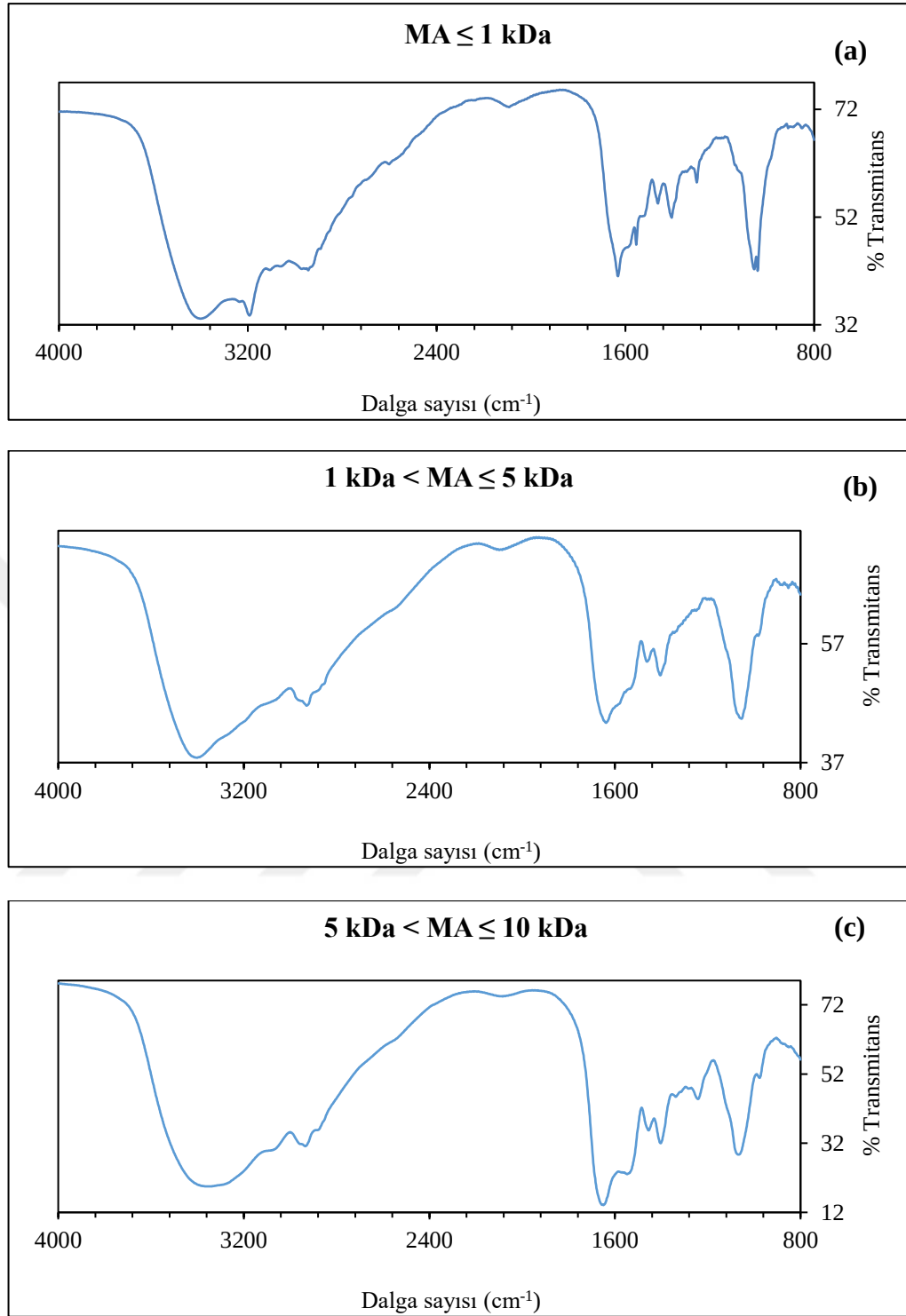
1688, 1680, 1672 ve 1666 cm^{-1} 'deki bantlar β -kıvrım (dönüş) yapısı ile ilişkilendirilmektedir (Chou ve Fasman, 1977; Dong ve ark, 1990; Holloway ve Mantsch, 1989). Bu bağlamda ≤ 1 kDa ve 1-5 kDa fraksiyonlarının ikincil yapısı β -plaka; 5-10 kDa ve > 10 kDa fraksiyonları ile SPH ve SPI'nin yapısı α -heliks olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.15. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının FTIR spektroskopisi ile elde edilen absorbands pikleri ve bu piklere atanmış titreşim türleri.

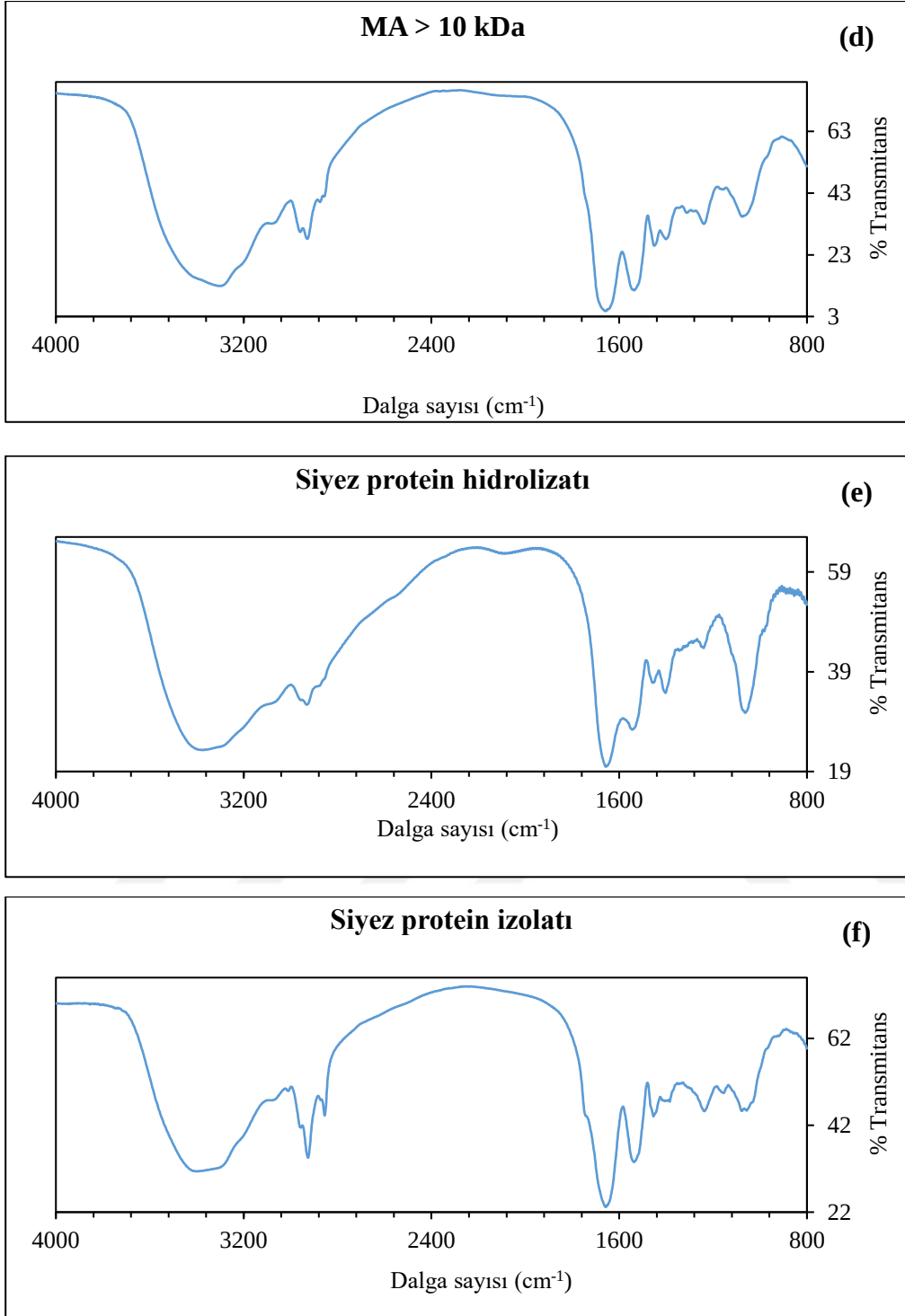
Titreşim türü	Dalga sayısı (frekans) (cm^{-1})					
	MA $\leq$ 1 kDa	1 kDa $<$ MA $\leq$ 5 kDa	5 kDa $<$ MA $\leq$ 10 kDa	MA $>$ 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
O-H gerilme titreşimi (alkoller veya fenoller)	3400	3402	-	-	3377	3406
N-H gerilme titreşimleri (aminler veya amidler) veya O-H gerilme titreşimi (alkoller veya fenoller)	3194	-	3350	3303	-	-
Alkenlerde veya aromatik bileşiklerde C-H gerilme titreşimleri	-	-	-	3084	-	-
Alkanlardan C-H gerilme titreşimleri (-CH ₂ - veya -CH ₃ grupları)	2945	2929	2935	2929	2931	2925
C $\equiv$ C gerilme titreşimleri (alkinler)	2092	2098	2085	-	-	-
C=O gerilme titreşimleri (karbonil grubu: ketonlar, aldehitler, karboksilik asitler, esterler) veya alkenlerde C=C gerilmesi	1631	1637	1649	1658	1657	1657
N-H bükülme titreşimleri (aromatik bileşiklerde amidler veya C=C gerilmesi)	-	-	1547	1537	1543	1537
Metil (-CH ₃) ve metilen (-CH ₂) gruplarının bükülme titreşimleri	1462	1462	1454	1450	1458	1454
Alkoller, fenoller veya alkanları gösteren O-H veya C-H bükülme titreşimleri	1404	1404	1404	1400	1404	-
C-H bükülme titreşimleri (çoğunlukla CH ₃ gruplarında)	-	-	1338	-	-	1385
Aminlerde C-N gerilme titreşimleri veya alkoller, eterler, esterler veya karboksilik asitlerde C-O gerilmesi	1298	-	1242	1238	1240	1238
Alkollerde, eterlerde veya esterlerde görülen C-O gerilme titreşimleri	1055	1055	1068	1076	1063	1078

Amide II bandı, tipik olarak 1530 ile 1550 cm^{-1} aralığında görünmektedir. Bu bant öncelikli olarak N-H grubunun eğilme titreşimleri ve amid bağı içindeki C-N gerilme titreşimlerine atfedilmektedir (Susi ve Byler, 1983). Buna göre MA: 5-10 kDa fraksiyonu ve SPH için orta; > 10 kDa fraksiyonu ve SPI için güçlü amid II bantları gözlenmiş, küçük MA'lı fraksiyonlarda (≤ 1 ve 1-5 kDa) ise amid II bandı kaybolmuştur (Şekil 4.16). Sonuç olarak, ikincil yapısı ağırlıklı olarak α -heliks olduğu belirlenen siyez proteinlerinin hidroliz sonrası yapısının korunduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, moleküler ağırlığı 5 kDa'dan fazla olan peptitlerin ağırlıklı olarak α -heliks, 5 kDa'dan küçük peptitlerin çoğunlukla β -plaka yapısında olduğu ultrafiltrasyon uygulaması sonucunda tespit edilmiştir.





Şekil 4.16. FTIR spektrumu: a) $MA \leq 1 \text{ kDa}$ b) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5 \text{ kDa}$ c) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10 \text{ kDa}$ d) $MA > 10 \text{ kDa}$ e) Siyez protein hidrolizatı f) Siyez protein izolatu.



Şekil 4.16. (Devamı) FTIR spektrumu: a) $MA \leq 1$ kDa b) $1 \text{ kDa} < MA \leq 5$ kDa c) $5 \text{ kDa} < MA \leq 10$ kDa d) $MA > 10$ kDa e) Siyez protein hidrolizatı f) Siyez protein izolatı.

4.4.9.2. Zeta potansiyeli

Siyez protein izolatı (SPI), siyez protein hidrolizatı (SPH) ve peptit fraksiyonlarının ölçülen zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.16’da verilmiştir. Bütün örnekler negatif zeta potansiyeline sahiptir. Toplam yükün negatif olması, COOH gruplarının fazla

olduğunu göstermektedir (Bozkurt ve ark, 2021). Peptit fraksiyonlarının zeta potansiyeli -14,1 ile -27,7 mV arasında tespit edilmiştir. En yüksek zeta potansiyeli değeri SPI için ve -31,5 mV olarak elde edilmiştir. SPH'nın potansiyeli SPI'ye göre önemli ölçüde azalarak -18,6 mV'a azalmıştır. Böylece hidroliz uygulamasının zeta potansiyelinin azalmasına neden olduğu gözlenirken, peptit büyüklüğü ile mV değerleri arasında bir bağlantı gözlenmemiştir. Tüm fraksiyonlar arasında MA > 10 kDa en yüksek zeta potansiyeline sahiptir.

Tablo 4.16. Siyez protein izolatu, hidrolizatu ve peptit fraksiyonlarının zeta potansiyeli değerleri.

	MA ≤ 1 kDa	1 kDa < MA ≤ 5 kDa	5 kDa < MA ≤ 10 kDa	MA > 10 kDa	Siyez protein hidrolizatu	Siyez protein izolatu
Zeta potansiyeli (mV)	-19,4 ± 0,2 D	-22,8 ± 1,8 C	-14,1 ± 0,7 E	-27,7 ± 1,4 B	-18,6 ± 0,4 D	-31,5 ± 0,4 A

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05) (n=3).

Zeta potansiyeli, bir dispersiyonda bulunan partiküllerin yüzeyinde bulunan elektrik yükünün bir ölçüsüdür. Bir emülsiyonun veya köpüğün kararlılığı zeta potansiyeliyle ilişkilidir (Muneer ve ark, 2023). Artan zeta potansiyeli proteinlerin açılmasına ve dispersiyon özelliklerinin gelişmesine katkıda bulunmakta, bunun sonucunda sulu ortamdaki partiküllerin stabilitesi artmaktadır. Zeta potansiyelinin mutlak değeri ne kadar büyükse (< -30 mV veya > +30 mV), damlacıklar arasındaki elektrostatik itme kuvveti o kadar büyük yapı da o kadar kararlı olmaktadır (Dickinson, 2009). Düşük zeta potansiyeli (-30 mV ve +30 mV arası) ise pıhtılaşma, flokülasyon veya kümeleşme (agregasyon) olasılığını arttırmakta ve fiziksel stabilitenin zayıflamasına yol açmaktadır (Gazikalović ve ark, 2022; Karami ve ark, 2022; Vallath ve Shanmugam, 2022). Zeta potansiyeli SPI için orta düzeyde ve MA > 10 kDa fraksiyonu için orta düzeye yakındır. Diğer örneklerin zeta potansiyeli kararlı yapının bozulmaya başladığına işaret etmektedir. Buna göre, SPI ve MA > 10 kDa fraksiyonu için elde edilen nispeten yüksek zeta potansiyeli değerleri dikkate alındığında, bu iki örneğin emülsiyon stabilitesinin diğer örneklerden daha yüksek olması beklenmektedir. Ancak bulgular düşük MA'daki fraksiyonların (MA ≤ 1 kDa) emülsiyon stabilitesinin daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu durum muhtemelen fraksiyonların hidrofilik ve hidrofobik amino asit gruplarının dağılımındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Zeta potansiyelinin belirlenmesi protein ve peptitlerin

fiziksel stabilitelerini kolay bir şekilde değerlendirme imkânı sunmaktadır; ancak doğru ve kesin bir değerlendirme yapabilirmek adına hidrofobik ve elektrostatik kuvvetlerin tüm etkisi göz önünde bulundurulmalıdır.

4.4.10. Amino asit kompozisyonu

Siyez unu, siyez protein izolatu (SPI) ve MA > 10 kDa peptit fraksiyonunun test edilen 19 amino asit türü için toplam amino asit kompozisyonu Tablo 4.17’de verilmiştir. Buna göre siyez ununda 8 adet amino asit tespit edilmiştir. Bu amino asitlerin dördü hidrofilik (aspartik asit, glutamik asit, glutamin, lisin), ikisi nötr (serin, glisin) ve ikisi hidrofobik (lösin, triptofan) karakterdedir. SPI’de siyez unu ile aynı amino asitlerin varlığı tespit edilmiş, farklı olarak tirozin gözlenmiştir. Tirozin siyez ununda bulunmazken SPI’de gözlenmesinin sebebi, unun SPI’ye kıyasla düşük olan protein miktarı ve buna bağlı olarak undaki tirozin konsantrasyonunun ölçüm sınırının altında kaldığı yönünde yorumlanmıştır. Ayrıca, benzer sebeple, SPI’de gözlenen amino asitlerin konsantrasyonu siyez unundaki amino asitlerden genel olarak daha yüksektir. Böylece SPI’de 4 hidrofilik, 3 nötr ve 2 hidrofobik olmak üzere toplam 9 adet amino asit türüne rastlanmıştır.

Tablo 4.17. Siyez unu, siyez protein izolatu ve MA > 10 kDa peptit fraksiyonunun toplam amino asit kompozisyonu.

Amino asit türü	Amino asit kompozisyonu (g/100 g)		
	Siyez unu	Siyez protein izolatu	MA > 10 kDa peptit fraksiyonu
Asp	0,434	2,432	5,234
Glu	0,32	0,342	4,969
Gln	0,033	0,077	0,01
Ser	0,077	0,129	0,64
Gly	0,011	0,106	1,33
His	TE	TE	0,07
Arg	TE	TE	TE
Thr	TE	TE	0,137
Ala	TE	TE	0,119
Pro	TE	TE	TE
Tyr	TE	0,281	1,518
Val	TE	TE	0,127
Met	TE	TE	TE
Cys	TE	TE	0,105
Ile	TE	TE	0,097
Leu	0,019	0,043	0,479
Trp	0,841	1,086	2,236
Phe	TE	TE	0,359
Lys	0,01	0,01	0,182
Hidrofilik	0,797	2,861	10,395
Hidrofobik	0,860	1,129	3,522
Toplam	1,745	4,506	17,612

*TE: Tespit edilemedi.

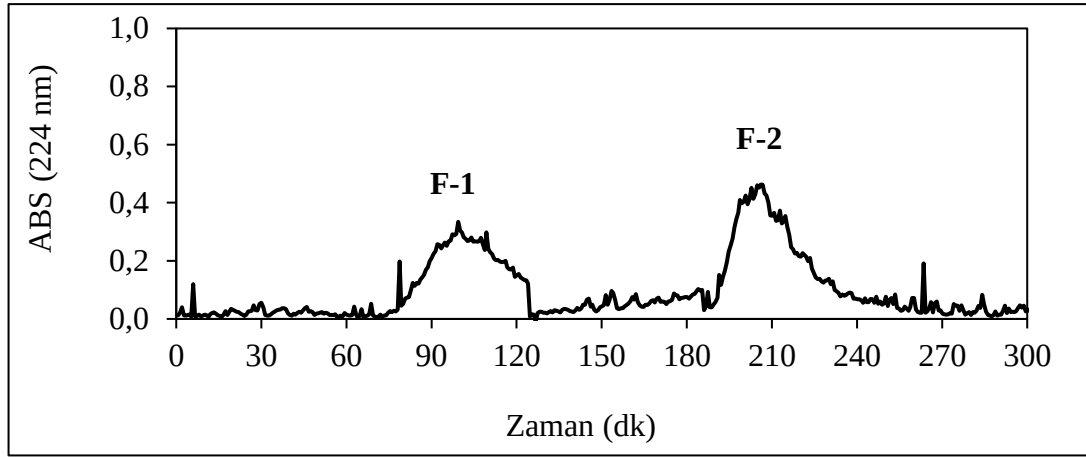
Yüzey hidrofobisitesi, bir proteinin yüzeyindeki hidrofobik kalıntıların/grupların dağılımını yansıtan ve böylece proteinin yüzey özelliklerindeki değişiklikleri tahmin etmede kullanılan temel göstergelerden biridir (Moghadam ve ark, 2020). Hidrofobik kuvvet, bir proteinin katlanmasını sağlayan esas itici güçtür. Hidrofobik etkileşimler nedeniyle çoğu protein küresel yapılarına katlanmakta, böylece molekül yüzeyinde yeterli sayıda hidrofobik kalıntı bulunmadığı için proteinlerin yüzey özellikleri zayıflamaktadır (Tang ve ark, 2021). Bunun sonucunda proteinlerin konformasyonel yapısı ve emülsiyon oluşturma, köpürme ve jelleşme gibi fonksiyonel özellikleri olumsuz etkilenmektedir. Uzaysal yapıdaki kısıtlamaları ortadan kaldırmak ve molekül yüzeyinde daha fazla hidrofobik kalıntı açığa çıkarmak için proteinlerin moleküler yapısı değiştirilebilmekte ve böylece proteinlerin modifiye edilmesiyle yüzey özellikleri iyileştirilebilmektedir (Arzeni ve ark, 2012; Tang ve ark, 2021). Çalışma kapsamında toplam amino asit kompozisyonunun belirlenmesiyle enzimatik hidroliz uygulaması sonucu elde edilen yüksek molekül ağırlığındaki peptitlerin yüzeyinde hidrofobik grupların fazla olduğu tespit edilmiştir. MA > 10 kDa peptit fraksiyonu test edilen 19 amino asitten 16'sını bulundurmakta olup amino asit kompozisyonu siyez unu ve SPI'den farklıdır. Peptit fraksiyonunda SPI'den farklı olarak 7 adet yeni amino asidin açığa çıktığı belirlenmiştir. Bu durum protein yapısında bağlı ya da gömülü durumdaki amino asitlerin enzimatik hidroliz sonucu serbest hale geldiğine işaret etmektedir. Açığa çıkan yeni amino asitlerin büyük çoğunluğu hidrofobik (alanin, sistein, valin, fenilalanin, izolösin), küçük bir kısmı ise nötr (histidin, treonin) karakterdedir.

Protein yapısının iç kısmında gömülü hidrofobik gruplar proteinin parçalanması sonucu yüzeye çıkmaktadır (Almeida ve ark, 2021). Bu bulgu, MA > 10 kDa fraksiyonunun SPI'den anlamlı ölçüde yüksek tespit edilen yüzey hidrofobisite değeri (H_0) ile tutarlılık göstermektedir. Buna karşın, peptit fraksiyonundaki hidrofilik amino asit sayısının toplam amino asit içeriğine oranı hidrofilik amino asitlerin toplam amino asit içeriğine oranının yaklaşık 3 katıdır. Sonuç olarak, hidroliz ve ultrafiltrasyon uygulaması sonrası hidrofilik ve hidrofobik amino asitlerin sayısı artmış; ancak daha çok hidrofilik özellikteki amino asitler açığa çıkmıştır. Ayrıca Asp, Glu, Ser, Gly, Tyr, Trp, Leu ve Lys miktarı peptit fraksiyonunda önemli düzeyde daha fazla olup fraksiyonun Met hariç bütün esansiyel amino asitleri (His, Thr, Val, Met, Arg, Trp, Phe, Ile, Leu ve Lys) içerdiği belirlenmiştir.

Bir peptit dizisinin amino asit kompozisyonu peptidin fonksiyonel özellikleri üzerinde doğrudan etkilidir. Peptit dizisinde prolin varlığı, prolin halkalarının endo ve ekzo konformasyonları arasındaki geçişi sebebiyle peptit yapısını daha esnek hale getirmektedir. Bunun sonucunda peptidin α -amilaza bağlanma ilgisinin artabileceği bildirilmektedir (Chow ve ark, 2018; Ibrahim ve ark, 2018). Amino asit kompozisyonu belirlenen siyez unu, protein izolatu ve MA > 10 kDa fraksiyonunda prolin tespit edilmemiş ve buna bağlı olarak α -amilaz inhibitör aktiviteye rastlanmamıştır. Bununla birlikte, hidrofobik gruplarla ilişkili olduğu bilinen gelişmiş antioksidan özellikler bu peptit fraksiyonunda gözlenmiştir. Sonuç olarak peptit amino asit içeriğinin biyolojik aktivite üzerindeki etkisi doğrulanmıştır.

4.4.11. Hidrofobik etkileşimle ayırım

Moleküler büyüklüğüne göre elde edilen peptit fraksiyonları içerisinde MA > 10 kDa fraksiyonu antioksidan ve fonksiyonel özellikleri açısından en yüksek potansiyele sahip fraksiyon olarak belirlenmiştir. Bu sebeple bu fraksiyon HEK sistemi ile ileri saflaştırılmıştır. Fraksiyon büyük moleküler yapısı ve yüksek hidrofobisitesi sebebiyle denatüre olmadan ve kolay ayırım sağlamak amacıyla ilk önce nispeten zayıf iyonik kuvvette tuz çözeltisi (0,2 M amonyum sülfat) ve ardından amonyum sülfat içermeyen fosfat tamponu ile ayrılmıştır. Ayırım sonucu elde edilen elüsyonların sabit dalga boyundaki absorbans değerlerinin zamana karşı grafiği çizilmiştir. Dalga boyu olarak fraksiyonun spektrum taraması sonucunda en yüksek absorbans değerinin elde edildiği değer (pik) olan 224 nm alınmıştır. Elüsyonların absorbans değerlerinin zamana karşı (dk) grafiği Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MA > 10 kDa fraksiyonunun hidroforik etkileşim kromatografisi ile ayrımı sonucu elde edilen kromatogram.

MA > 10 kDa fraksiyonunun hidroforik etkileşimlere göre ileri ayrımı sonucu iki farklı pik edilmiştir (F1: ~75-120 dk; F2: ~190-240 dk). HEK sisteminde biyomoleküller, yüksek tuz konsantrasyonunda zayıf hidroforik yüzeye adsorbe olmaktadır. Buna göre gözlenen ilk pike ait fraksiyon (F-1), içeriğinde görece zayıf hidroforik karakterdeki peptitlerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Tuz konsantrasyonun düşürülmesi sonrası elde edilen ikinci pike ait fraksiyon (F-2) ilk fraksiyona kıyasla daha fazla hidroforik peptit varlığına işaret etmektedir.

Hidroforik etkileşim kromatografisi (HEK) biyolojik bileşiklerin laboratuvar ölçeğinde ve endüstriyel ölçekte saflaştırılmasında kullanılan güçlü bir tekniktir. HEK, denatüre edici olmayan tuzla çöktürme işlemi ile yüksek ayırım ve iyi geri kazanım aktivitesi elde edilmesini sağlayan bir kromatografi tekniğidir. Ayrımında, biyomolekül yüzeyindeki hidroforik bölgelerin, kromatografi destek materyali, bir diğer ifade ile sabit fazda immobilize (gömülü) halde bulunan hidroforik ligandlara bağlanmasından yararlanır. Pek çok protein saflaştırma protokolünde uygulanabilecek HEK, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi gibi genel bir tekniktir, bununla birlikte ayırım gücü daha yüksektir. Bu yöntem ayrıca daha zayıf etkileşime sahip olduğu için proteinlerin biyolojik aktivitesinin daha fazla korunmasını sağlamaktadır (Tomaz, 2017).

4.4.12. Proteinlerin tanımlanması

Moleküler büyüklüğü > 10 kDa peptit fraksiyonu ile bu fraksiyonun HEK ile saflaştırılması sonucu elde edilen ileri fraksiyonların (F-1 ve F-2) kütle spektrometresi

ile içeriğindeki protein yapılar tür ve moleküler büyüklüğü için teorik olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. MA > 10 kDa, F-1 ve F-2 fraksiyonlarının protein türü ve moleküler büyüklüğü dağılımı.

Peptit fraksiyonu					
MA > 10 kDa		F-1		F-2	
Protein türü	kDa	Protein türü	kDa	Protein türü	kDa
Düşük molekül ağırlıklı glutenin	31,1	Yüksek molekül ağırlıklı glutenin	88	Yüksek molekül ağırlıklı glutenin	88
Yüksek molekül ağırlıklı glutenin	88	Tripsin/ α -amilaz inhibitörü	16	Dimerik α -amilaz inhibitörü	13,5
β -amilaz (Fragman)	9,6	Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz	52,1	β -amilaz (Fragman)	9,6
Süperoksit dismutaz	25,3			Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	20,2
Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz	52				
Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	10,4				

Siyez proteinleri için seçilen ekstraksiyon koşullarında, buğday proteinlerinin prolamin olmayan gruptaki suda çözünür albüminler ile prolamin gruptaki alkali pH'da çözünür glütenin proteinlerinin izole edilmesi hedeflenmiş, protein tanımlanması ile düşük ve yüksek molekül ağırlıklı glutenin proteinlerinin varlığı ekstraksiyonun etkinliğini doğrulamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada siyez unundan gelişmiş biyoaktif ve fonksiyonel özellikte ürün elde edilmiştir. Siyez unu hidrolizatları ticari proteazlar ve *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 kaynaklı ham proteaz kullanılarak üretilmiş, öncelikli olarak siyez ununun ve ham enzimin fonksiyonel ürün geliştirmede kullanım potansiyeli ortaya konmuştur. Ayrıca, uygulanan yöntem siyez proteinlerinin ekstraksiyonuna ve enzimin saflaştırılmasına olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır. Bu çalışma genel olarak biyoaktif hidrolizatların üretimi için zaman ve enerji tüketen, zehirli kimyasalların kullanıldığı yaklaşımlara umut verici bir alternatif sunmaktadır.

Enzim türü ve E/S oranının seçimi, hidrolizatların biyolojik ve teknolojik özellikleri üzerinde önemli bir etki yaratmıştır. Tüm hidrolizatların antioksidan potansiyelinin güçlü olduğu belirlenmiş, bununla birlikte *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 hidrolizatları diğer hidrolizatlar arasında çok daha gelişmiş yağ tutma kapasitesi ile emülsiyon ve köpük stabilitesi sergilemiştir. Ham proteaz hidrolizatlarının dikkat çeken antioksidan aktiviteleri nedeniyle süt ve fırıncılık ürünleri gibi yağ içeriği zengin gıda formülasyonlarında ransiditeyi önlemede doğal katkı maddesi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Ham enzim olarak kullanılan *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7'nin gelişim sıvısından elde edilen hücresiz süpernatant amilaz, esteraz ve lipaz gibi proteaz dışındaki enzimleri de içerebilen kompleks bir yapıdır. Bu sebeple, ham enzimle üretilen hidrolizatlarının dikkat çeken tekno-fonksiyonel özelliklerinin siyez unundaki proteinlerin yanı sıra kompleks karbonhidratların parçalanmasıyla da ilişkili olabileceği ve böylece daha kararlı bir yapı oluşumunun gerçekleştiği düşünülmektedir.

Hidrolizatların antioksidan potansiyeli spektrofotometrik analizler ile tespit edilmiştir; ancak antioksidan özelliklerin daha derinlemesine ortaya konmasının çalışmanın kapsamını genişleteceğine inanılmaktadır. Bu sebeple çalışmanın hücre kültürü testlerinin kullanıldığı diğer *in vitro* antioksidan aktivite analizleriyle zenginleştirilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte, elde edilen hidrolizatların antioksidan olarak gıda formülasyonlarında yer alma potansiyeli bulunmaktadır. Yeni

ürün geliştirme çalışmalarında raf ömrü testleri ve duyusal analiz bilinen ve gerekli uygulamalardır. Bununla birlikte, gıda güvenliği göz önünde bulundurularak, olası engel ve sınırlamaları ortadan kaldırmak adına bu uygulamalardan önce sitotoksitesite analizlerinin gerçekleştirilmesi, böylece ürün güvenilirliğinin tam kapsamlı olarak ortaya konması önem taşımaktadır. Son olarak, mevcut yöntemin etkinliğini ortaya koymak ve kıyaslama yapabilmek adına, hidrolizatların siyez unundan ekstrakte edilen proteinler ile (ham proteaz kullanılarak) üretilmesi ve protein hidrolizatlarının bu çalışmaya benzer şekilde biyolojik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi önerilmektedir.

Çalışmanın ikinci kısmında, siyez proteinlerinin *Bacillus mojavensis* sp. EBTA7 izolatından elde edilen ham enzim ile hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlar moleküler büyüklüğüne göre ayrılmış ve fraksiyonlar arasında MA > 10 kDa genel olarak yüksek etkinlikte antioksidan kapasite sergilemiştir. Bu durum, ultrafiltrasyon işleminin peptit biyoaktivitesine katkıda bulunduğunu gösterirken aynı zamanda tekno fonksiyonel özellikler de iyileşmiştir. Özetle, siyez proteinlerinden biyoaktif ve fonksiyonel özellikte ürün geliştirilebileceği bu çalışma ile kanıtlanmış, ayrıca, laboratuvar ortamında üretilen bakteriyel ham enzimin tespit edilen yüksek proteolitik aktivitesine bağlı olarak hidrolizdeki etkinliği gösterilmiştir. Yüksek potansiyel taşıyan MA > 10 kDa fraksiyonunun molekül boyutunun çok büyük olması sebebiyle peptit dizisinin belirlenmesi mümkün olmamıştır. Bu sebeple yalnızca amino asit kompozisyonu belirlenmiştir. Ayrıca, bu fraksiyonun saflaştırılması ile elde edilen F-1 ve F-2 ileri fraksiyonları yetersiz örnek miktarı sebebiyle sadece içeriğindeki protein yapıların türü ve MA'sının belirlenmesi için analiz edilmiş ve içeriğinde yüksek molekül ağırlıklı glütenin (88 kDa) protein molekülüne rastlanmıştır. Tanımlanan peptit fraksiyonlarının gıdalara dahil edilmesinin, gıdanın raf ömrünü artırabileceği gibi insan dejeneratif hastalıklarına karşı koruyucu bir bileşen olarak da görev yapabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma, siyez ununun hafif seviyede enzimatik hidrolizi ile gelişmiş biyolojik ve tekno fonksiyonel özelliklerle donatılmış, katma değerli bir ürüne dönüşme potansiyelini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Moslehishad, M., & Salami, M. (2022). Antioxidant and alpha-glucosidase enzyme inhibitory properties of hydrolyzed protein and bioactive peptides of quinoa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 602-609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.189>
- Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (2002). Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 737-747. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1094>
- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.006>
- Abeynayake, R., Zhang, S., Yang, W., & Chen, L. (2022). Development of antioxidant peptides from brewers' spent grain proteins. *LWT*, 158, 113162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113162>
- Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
- Agyei, D., & Danquah, M. K. (2012). Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.010>
- Ai, M., Tang, T., Zhou, L., Ling, Z., Guo, S., & Jiang, A. (2019). Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 87, 933-942. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.023>
- Akbari, M., Razavi, S. H., Khodaiyan, F., Blesa, J., & Esteve, M. J. (2023). Fermented corn bran: A by-product with improved total phenolic content and antioxidant activity. *LWT*, 184, 115090. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115090>
- Akhmadeeva, L. (2018). *Farklı kaynaklardan enzimatik hidroliz yoluyla biyoaktif peptid eldesi ve biyolojik etkinliklerinin incelenmesi* [Yüksek lisans tezi]. Ege Üniversitesi.
- Akhtar, M. A., Butt, M. Q. S., Afroz, A., Rasul, F., Irfan, M., Sajjad, M., & Zeeshan, N. (2024). Approach towards sustainable leather: Characterization and effective industrial application of proteases from *Bacillus* sps. for ecofriendly dehairing of leather hide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266, 131154. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131154>

- Alahmad, K., Noman, A., Xia, W., Jiang, Q., & Xu, Y. (2023). Influence of the enzymatic hydrolysis using flavourzyme enzyme on functional, secondary structure, and antioxidant characteristics of protein hydrolysates produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Molecules*, 28(2), 519. <https://doi.org/10.3390/molecules28020519>
- Alix, E., & Blanc-Potard, A. B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Molecular Microbiology*, 72(1), 5-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06626.x>
- Almeida, F. C., Sanches, K., Pinheiro-Aguiar, R., Almeida, V. S., & Caruso, I. P. (2021). Protein surface interactions—theoretical and experimental studies. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 706002. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.706002>
- Aluko, R. E. (2008). Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. *Journal of AOAC International*, 91(4), 947-956. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.947>
- Aluko, R. E., & Monu, E. (2003). Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(4), 1254-1258.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125-1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>
- Ashwini, P., & Manjusha, D. (2023). Microbial Proteases: Potential Tools for Industrial Applications. *Research Journal of Biotechnology*, 18(2), 159-171.
- Asim, M., Nadeem, M., Nisar, K., Kaleem, A., & Iqtedar, M. (2022). Optimization, purification, kinetic analysis and applications of alkaline proteases produced from *Bacillus subtilis* utilizing agricultural by-products through solid state fermentation. *Kuwait Journal of Science*, 49(4). <https://doi.org/10.48129/kjs.12103>
- Athira, S., Mann, B., Sharma, R., Pothuraju, R., & Bajaj, R. K. (2021). Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification. *Food Research International*, 141, 110133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110133>
- Avcı, A., Demir, S., & Akçay, F. A. (2021). Production, properties and some applications of protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. EBTA6. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 803-810. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1858429>

- Awosika, T. O., & Aluko, R. E. (2019). Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 2021-2034. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14087>
- Ayad, R., & Akkal, S. (2019). Phytochemistry and biological activities of Algerian *Centaurea* and related genera. In F. R. S. Atta-Ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 357-414). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00012-5>
- Aydemir, L. Y., & Yemenicioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 686-694. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.023>
- Aydemir, L. Y., Diblan, S., Aktas, H., & Cakitli, G. (2022). Changes in bioactive properties of dry bean extracts during enzymatic hydrolysis and in vitro digestion steps. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 3682-3698. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01484-1>
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Balachandran, C., Vishali, A., Nagendran, N. A., Baskar, K., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2021). Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4263-4269. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.069>
- Balakrishnan, P., Thamaraichelvan, R., Rajendran, N., & Flanet, R. (2012). Production and purification of alkaline serine protease from marine *Bacillus* species and its application in detergent industry. *European Journal of Applied Sciences*, 4, 21-26.
- Ballester-Sánchez, J., Millán-Linares, M. C., Fernández-Espinar, M. T., & Haros, C. M. (2019). Development of healthy, nutritious bakery products by incorporation of quinoa. *Foods*, 8(9), 379. <https://doi.org/10.3390/foods8090379>
- Bamdad, F., Wu, J., & Chen, L. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.01.006>
- Bao, Z. J., Zhao, Y., Wang, X. Y., & Chi, Y. J. (2017). Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 669-678. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2504-0>
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods*, 6, 317-327. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9441-3>

- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
- Bashary, R., Vyas, M., Nayak, S. K., Suttee, A., Verma, S., Narang, R., & Khatik, G. L. (2020). An insight of alpha-amylase inhibitors as a valuable tool in the management of type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 16(2), 117-136. <https://doi.org/10.2174/1573399815666190618093315>
- Bazsefidpar, N., Ahmadi Gavlighi, H., Ghandehari Yazdi, A. P., & Jafari, S. M. (2024). Optimization of protein extraction from brewer's spent grain and production of bioactive peptides. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(15), 17455-17465. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03932-4>
- Belderok, B., Mesdag, J., Mesdag, H., & Donner, D. A. (2000). *Bread-making quality of wheat: A century of breeding in Europe*. Springer Science & Business Media.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 151-160. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00311-3)
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L., & Frost, B. (1987). A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70(2), 241-247. <https://doi.org/10.1093/jaoac/70.2.241>
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Birinyi, Z., Réder, D., Diós, Á., Korponay-Szabó, I. R., Hunyadi-Gulyás, É., Florides, C. G., ... & Gell, G. (2022). Immunoanalytic investigation of grain proteins antigenic for celiac disease patients in an einkorn collection. *Food Chemistry*, 371, 131148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131148>
- Biškauskaitė, R., Lee, W. C., & Valeika, V. (2024). Crude proteolytic enzyme from *Bacillus halodurans* BCRC 910501 and its application in leather processing. *Heliyon*, 10(16). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35842>
- Bobkov, S. V., Zotikov, V. I., & Uvarova, O. V. (2018). *Optimization of protein extraction from buckwheat seeds*. Crop Husbandry.
- Bode, W. (2006). Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36(2), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.027>
- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., & Nasri, M. (2012). Protein hydrolysates from bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 841-852. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0053-y>

- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118(3), 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>
- Bozkurt, F., Bekiroglu, H., Dogan, K., Karasu, S., & Sagdic, O. (2021). Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 149, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111787>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandolini, A., Hidalgo, A., & Moscaritolo, S. (2008). Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 599-609. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.005>
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5391-5393. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5391>
- Bruno, S. F., Kudre, T. G., & Bhaskar, N. (2019). Effects of different pretreatments and proteases on recovery, umami taste compound contents and antioxidant potentials of *Labeo rohita* head protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1966-1977. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03663-3>
- Byrne, B., Beattie, J. W., Song, C. L., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging of proteins. In Y. Ozaki, M. Baranska, I. K. Lednev, & B. R. Wood (Eds.), *Vibrational Spectroscopy in Protein Research* (pp. 1-22). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818610-7.00001-3>
- Castro, H. C., Abreu, P. A., Geraldo, R. B., Martins, R. C., dos Santos, R., Loureiro, N. I., & Rodrigues, C. R. (2011). Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2), 165-181. <https://doi.org/10.1002/jmr.1091>
- Cermeño, M., Kleekayai, T., Amigo-Benavent, M., Harnedy-Rothwell, P., & FitzGerald, R. J. (2020). Current knowledge on the extraction, purification, identification, and validation of bioactive peptides from seaweed. *Electrophoresis*, 41(20), 1694-1717. <https://doi.org/10.1002/elps.202000153>
- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., & Fiat, A. M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from α -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*, 73(4), 583-590. <https://doi.org/10.1079/BJN19950060>
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., ... & Fiat, A. M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80(2), 155-165. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80022-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80022-9)

- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., & Dinesh Kumar, B. (2015). Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5817-5825. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1714-6>
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
- Chauhan, A., & Jindal, T. (2020). Biochemical and molecular methods for bacterial identification. In *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis* (pp. xx-xx). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52024-3_10
- Chen, H. J., Dai, F. J., Chen, C. Y., Fan, S. L., Zheng, J. H., Chau, C. F., & Chen, C. S. (2023). Effects of molecular weight fraction on antioxidation capacity of rice protein hydrolysates. *Scientific Reports*, 13(1), 3464. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14314-7>
- Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 887-897. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.013>
- Chen, L., Li, D., Zhu, C., Rong, Y., & Zeng, W. (2021). Characterisation of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of golden melon seeds protein. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(11), 5904-5912. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15250>
- Chen, Y., Zheng, Z., Ai, Z., Zhang, Y., Tan, C. P., & Liu, Y. (2022). Exploring the antioxidant and structural properties of black bean protein hydrolysate and its peptide fractions. *Frontiers in Nutrition*, 9, 884537. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.884537>
- Cheng, Y. H., & Wang, Z., & Xu, S. Y. (2006). Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro. *Journal of Central South University of Technology*, 13, 160-165. <https://doi.org/10.1007/s11771-006-0149-7>
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1977). β -turns in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 115(2), 135-175. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90094-8)
- Chow, W. Y., Forman, C. J., Bihan, D., Puzskarska, A. M., Rajan, R., Reid, D. G., & Duer, M. J. (2018). Proline provides site-specific flexibility for in vivo collagen. *Scientific Reports*, 8(1), 13809. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31937-x>
- Christa, K., & Soral-Śmietana, M. (2008). Buckwheat grains and buckwheat products—nutritional and prophylactic value of their components—a review. *Czech Journal of Food Science*, 26(3), 153-162.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R. (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.003>

- Cian, R. E., Vioque, J., & Drago, S. R. (2015). Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, 69, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.036>
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 10815-10837). John Wiley & Sons Ltd.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321-334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Cooper, R. (2015). Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(3), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.02.004>
- Cotabarren, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García-Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D., & Parisi, M. G. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with papain. *Food Chemistry*, 274, 848-856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>
- Crespo, S. (2018). Inhibitory effect of peptide fractions derivatives from chia (*Salvia hispanica*) hydrolysis against α -amylase and α -glucosidase enzymes. *Nutricion Hospitalaria*, 35(4), 928-935. <https://doi.org/10.20960/nh.1713>
- Cruz-Solis, I., Ibarra-Herrera, C. C., Rocha-Pizaña, M. D. R., & Luna-Vital, D. (2023). Alkaline extraction–isoelectric precipitation of plant proteins. In *Green Protein Processing Technologies from Plants: Novel Extraction and Purification Methods for Product Development* (pp. 1-29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16968-7_1
- Csákvári, E., Halassy, M., Enyedi, A., Gyulai, F., & Berke, J. (2021). Is einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) a better choice than winter wheat (*Triticum aestivum* L.)? Wheat quality estimation for sustainable agriculture using vision-based digital image analysis. *Sustainability*, 13(21), 12005. <https://doi.org/10.3390/su132112005>
- Cui, C., Zhao, H., Zhao, M., & Chai, H. (2011). Effects of extrusion treatment on enzymatic hydrolysis properties of wheat gluten. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 187-203. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00348.x>
- Çağlar, A. F. (2019). *Yağı alınmış fındık posalarının tripsin, kimotripsin ve termolisin enzimleri ile muamele edilmesi sonucu oluşan bazı biyoaktif peptitlerin belirlenmesi* [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi.
- Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81(4-5), 1300-1309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.025>
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>

- Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2021). In vivo bioactivities of food protein-derived peptides—a current review. *Current Opinion in Food Science*, 39, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.002>
- Daşkaya-Dikmen, C. (2018). *Soğukta aktif enzim üretimi ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü biyoaktif peptit eldesinde kullanılması* [Doktora tezi]. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & Lopez-Fandino, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67, 1939–1944. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1939>
- de Castro, R. J. S., Cason, V. G., & Sato, H. H. (2017). Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.003>
- del Mar Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.017>
- Dela Pena, I. J. I., Hong, E., De La Pena, J. B., Kim, H. J., Botanas, C. J., Hong, Y. S., ... & Cheong, J. H. (2015). Milk collected at night induces sedative and anxiolytic-like effects and augments pentobarbital-induced sleeping behavior in mice. *Journal of Medicinal Food*, 18(11), 1255-1261. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3448>
- Delhay, S., & Landry, J. (1992). Determination of tryptophan in pure proteins and plant material by three methods. *Analyst*, 117(12), 1875-1877. DOI <https://doi.org/10.1039/AN9921701875>
- Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H., & Feng, F. (2016). Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usamii*. *PLoS One*, 11(7), e0160101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160101>
- Devi, L. M., & Badwaik, L. S. (2021). Influence of temperature, time and alkali concentration on protein extraction from muskmelon seed meal. *Indian Chemical Engineer*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/00194506.2021.1915887>
- Dhull, S. B., Kinabo, J., & Uebersax, M. A. (2023). Nutrient profile and effect of processing methods on the composition and functional properties of lentils (*Lens culinaris* Medik): A review. *Legume Science*, 5(1), e156. <https://doi.org/10.1002/leg3.156>
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510-515. <https://doi.org/10.1002/iub.186>
- Di Stasio, L., Picascia, S., Auricchio, R., Vitale, S., Gazza, L., Picariello, G., & Mamone, G. (2020). Comparative analysis of in vitro digestibility and immunogenicity of gliadin proteins from durum and einkorn wheat. *Frontiers in Nutrition*, 7, 56. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00056>

- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dinesh, Y., & Singh, N. K. (2011). Wheat triticin: A potential target for nutritional quality improvement. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-21. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.1.21>
- do Evangelho, J. A., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., De Berrios, J. J., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>
- Dong, A., Huang, P., & Caughey, W. S. (1990). Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 29(13), 3303-3308.
- Dong, K., Ge, P., Ma, C., Wang, K., Yan, X., Gao, L., & Yan, Y. (2012). Albumin and globulin dynamics during grain development of elite Chinese wheat cultivar Xiaoyan 6. *Journal of Cereal Science*, 56(3), 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.08.016>
- Drago, S. R., & Gonzalez, R. J. (2000). Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(4), 269-273. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00034-5)
- Du, T., Xu, J., Zhu, S., Yao, X., Guo, J., & Lv, W. (2022). Effects of spray drying, freeze drying, and vacuum drying on physicochemical and nutritional properties of protein peptide powder from salted duck egg white. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1026903. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1026903>
- DuPont, F. M., & Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, 38(2), 133-146. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00030-4)
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., & Świeca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*, 141(3), 2177-2183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.012>
- Dutta, R. C. (2002). Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunology Letters*, 83(3), 153-161. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00066-4)
- Eckert, E., Han, J., Swallow, K., Tian, Z., Jarpa-Parra, M., & Chen, L. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration on physicochemical and functional properties of faba bean protein. *Cereal Chemistry*, 96(4), 725-741. <https://doi.org/10.1002/cche.10169>
- El Hajj, S., Irankunda, R., Echavarria, J. A. C., Arnoux, P., Paris, C., Stefan, L., & Canabady-Rochelle, L. (2023). Metal-chelating activity of soy and pea protein hydrolysates obtained after different enzymatic treatments from protein isolates. *Food Chemistry*, 405, 134788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134788>

- Elkhtab, E., El-Alfy, M., Shenana, M., Mohamed, A., & Yousef, A. E. (2017). New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9508-9520. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13150>
- Elmalimadi, M. B., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Tanasković, S. J., Djurović, S. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.008>
- Elsohaimy, S. A., Refaay, T. M., & Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.007>
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010>
- Erkan, E., & Yılmaz, N. K. (2009). Samsun İli Buğday Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Saptanması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2), 67-75.
- Esfandi, R., Willmore, W. G., & Tsopmo, A. (2019). Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their in vitro antioxidant and metal chelating properties. *Food Chemistry*, 279, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.110>
- Espoui, A. H., Larimi, S. G., & Darzi, G. N. (2022). Optimization of protease production process using bran waste using *Bacillus licheniformis*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 39(3), 674-683. <https://doi.org/10.1007/s11814-021-0965-3>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Ewert, J., Eisele, T., & Stressler, T. (2022). Enzymatic production and analysis of antioxidative protein hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 248(8), 2167-2184. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04022-x>
- Faiad, S., Naji, E., & Hajeej, J. (2019). Optimization for extraction proteins from pulp of watermelon seed. *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*, 19(2), 75-83. <https://doi.org/10.25130/tjas.19.2.9>
- Fajardo-Espinoza, F. S., Romero-Rojas, A., & Hernández-Sánchez, H. (2020). Production of bioactive peptides from bovine colostrum whey using enzymatic hydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 1-9.
- Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, O. S., Taiwo, K. A., Oyedele, D., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. (2021). Antioxidant and enzymes inhibitory properties of Amaranth leaf protein hydrolyzates and ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 45(3), e13396. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13396>

- Fan, C., Ge, X., Hao, J., Wu, T., Liu, R., Sui, W., & Zhang, M. (2023). Identification of high iron–chelating peptides with unusual antioxidant effect from sea cucumbers and the possible binding mode. *Food Chemistry*, 399, 133912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133912>
- FAO. (2003). *Food energy—Methods of analysis and conversion factors* (FAO Food and Nutrition Paper, Report of a Technical Workshop, Vol. 77). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fausnaugh, J. L., Pfannkoch, E., Gupta, S., & Regnier, F. E. (1984). High-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry*, 137(2), 464-472. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90114-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90114-3)
- Feng, Y. X., Ruan, G. R., Jin, F., Xu, J., & Wang, F. J. (2018). Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates. *LWT*, 92, 40-46.
- Ferhat, R., Ferhat, M., Öztürk, M., Duru, M. E., Çetintaş, Y., Çayan, G. T., & Laroui, S. (2016). Antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian pomaceolive oil. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 6(4), 8-14.
- Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x>
- Föste, M., Elgeti, D., Brunner, A. K., Jekle, M., & Becker, T. (2015). Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.06.003>
- Froehlich, J. C. (1997). Opioid peptides. *Alcohol Health and Research World*, 21(2), 132.
- Fruton, J. S. (1976). The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 44, 1-36. <https://doi.org/10.1002/9780470122891>
- Fuentes, L. R., Richard, C., & Chen, L. (2021). Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein. *Journal of Functional Foods*, 87, 104829. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104829>
- Gao, J., Tang, Z. S., He, S., Powell, W., & Brennan, C. S. (2023). The foaming properties of sweet potato protein hydrolysates produced by Alcalase and Ficin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(8), 4157-4163. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12420>
- Garg, S. (2019). *Evaluation of production of opioid peptides from wheat proteins* [Doktora tezi]. Victoria University.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>
- Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljica, N., Luković, N., Jakovetić Tanasković, S., Culetu, A., & Knežević-Jugović, Z. (2022). Hydrolysis of soft wheat flour: Enhanced functional properties and the effect of starch on allergenicity reduction. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10), e15925. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15925>

- Gazza, L., Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2023). A high protein ancient wheat species: Einkorn. *Journal of Cereal Science*, 103790. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103790>
- Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2000). Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6215-6218. <https://doi.org/10.1021/jf000478m>
- Gençkal, H., & Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 703-710. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.004>
- Gharibzahedi, S. M. T., Smith, B., & Altintas, Z. (2024). Bioactive and health-promoting properties of enzymatic hydrolysates of legume proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(9), 2548-2578. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2124399>
- Gharibzahedi, S. M. T., Smith, B., & Guo, Y. (2019). Pectin extraction from common fig skin by different methods: The physicochemical, rheological, functional, and structural evaluations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.040>
- Ghelich, S., Ariaei, P., & Ahmadi, M. (2022). Evaluation of functional properties of wheat germ protein hydrolysates and its effect on physicochemical properties of frozen yogurt. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(2), 69. <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10378-1>
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.003>
- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2013). Reverse-phase HPLC separation of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate produced peptide fractions with enhanced antioxidant capacity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 39-46. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0340-6>
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00139.x>
- Golea, C. M., Codină, G. G., & Oroian, M. (2023). Prediction of wheat flours composition using fourier transform infrared spectrometry (FT-IR). *Food Control*, 143, 109318. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109318>

- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Bioactive peptides from germinated soybean with anti-diabetic potential by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV, α -amylase, and α -glucosidase enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2883. <https://doi.org/10.3390/ijms19102883>
- Grausgruber, H., Sailer, C., Ghambashidze, G., Bolyos, L., & Ruckenbauer, P. (2004). Genetic variation in agronomic and qualitative traits of ancient wheats. *Genetic variation for plant breeding: Proceedings of the 17th EUCARPIA General Congress* (ss. 19–22) içinde.
- Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2013). *Advanced nutrition and human metabolism*. Cengage Learning.
- Grusak, M. A. (2009). Nutritional and health-beneficial quality. In W. Erskine, F. J. Muehlbauer, A. Sarker, & B. Sharma (Eds.), *The lentil: Botany, production and uses* (pp. 368–390). CABI.
- Gu, L., Peng, N., Chen, S., McClements, D. J., Tang, Z., Li, J., & Yang, Y. (2024). Bioactive peptides derived from quinoa protein: Fabrication, antioxidant activities, and in vitro digestion profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(2), 894-903. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02212-z>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2022). Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*, 10(1), 132. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>
- Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 21-33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>
- Gürkan, H. (2019). *Bazı mayaların beyaz peynirde uçucu aroma bileşikleri ve proteoliz düzeyine katkısı ile biyoaktif peptit üretme performanslarının belirlenmesi* [Doktora tezi]. İnönü Üniversitesi.
- Hachimura, S., Totsuka, M., & Hosono, A. (2018). Immunomodulation by food: Impact on gut immunity and immune cell function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(4), 584-599. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1433017>
- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 100(13), 3366-3373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.061>
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.002>

- Halim, N. R. A., & Sarbon, N. M. (2020). Characterization of Asian swamp eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate functional properties prepared using Alcalase® enzyme. *Food Research*, 4(1), 207-215.
- Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Nasri, M., & Bayoudh, A. (2018). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148>
- Hamza, T. A. (2017). Bacterial protease enzyme: Safe and good alternative for industrial and commercial use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 3(1), 1-10.
- Hancock, R. D. (1992). Chelate ring size and metal ion selection. The basis of selectivity for metal ions in open-chain ligands and macrocycles. *Journal of Chemical Education*, 69(8), 615.
- Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Hao, L., Li, X., Zhao, B., Song, X., Zhang, Y., & Liang, Q. (2024). Enzymatic hydrolysis optimization of yak whey protein concentrates and bioactivity evaluation of the ultrafiltered peptide fractions. *Molecules*, 29(6), 1403. <https://doi.org/10.3390/molecules29061403>
- Haque, E., Chand, R., & Kapila, S. (2008). Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, 25(1), 28-43. <https://doi.org/10.1080/87559120802458198>
- Harnedy, P. A., O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed *Palmaria palmata* protein isolate. *Food Research International*, 100, 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.037>
- Hassan, M. A., Haroun, B. M., Amara, A. A., & Serour, E. A. (2013). Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. *Biomed Research International*, 2013, 175012. <https://doi.org/10.1155/2013/175012>
- Hayıt, F., & Gül, H. (2017). Çölyak ve çölyak hastaları için üretilen ekmeklerin kalite özellikleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(1), 163-169. <https://doi.org/10.21597/jist.2017127429>
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327-347. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.008>
- Hernández-Jabalera, A., Cortés-Giraldo, I., Dávila-Ortíz, G., Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., & Jiménez-Martínez, C. (2015). Influence of peptides–phenolics interaction on the antioxidant profile of protein hydrolysates from *Brassica napus*. *Food Chemistry*, 178, 346-357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.063>

- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- Hewage, A., Olatunde, O. O., Nimalaratne, C., Malalgoda, M., Aluko, R. E., & Bandara, N. (2022). Novel extraction technologies for developing plant protein ingredients with improved functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 129, 492-511. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.10.016>
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2008). Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chemistry*, 107(1), 444-448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.009>
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 601-612. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6382>
- Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., & Nasri, M. (2011). Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases. *Food Research International*, 44(9), 2703-2711. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.023>
- Holloway, P. W., & Mantsch, H. H. (1989). Structure of cytochrome b5 in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 28(3), 931-935.
- Hoyle, N. T., & Meritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 76-77.
- Hrckova, M., Rusnakova, M., & Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(1), 7-14.
- Hu, R., Chen, G., & Li, Y. (2020). Production and characterization of antioxidative hydrolysates and peptides from corn gluten meal using papain, ficin, and bromelain. *Molecules*, 25(18), 4091. <https://doi.org/10.3390/molecules25184091>
- Hunter, R. J. (1988). *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press. ISBN: 0-12-361960-2.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W., & Gaspar, A. R. (2018). Structural properties of bioactive peptides with α -glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 91(2), 370-379. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13105>
- Ikram, S., Zhang, H., Ahmed, M. S., & Wang, J. (2020). Ultrasonic pretreatment improved the antioxidant potential of enzymatic protein hydrolysates from highland barley brewer's spent grain (BSG). *Journal of Food Science*, 85(4), 1045-1059. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15063>

- Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Guzmán, F., Alvarez, C. A., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V., & Hernández-Ledesma, B. (2019). Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of *Erythrina edulis* (pajuro) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2420-2427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9449>
- Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., & Masud, T. (2015). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 231-239. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0920-8>
- Jancurová, M., Minarovicová, L., & Dandar, A. (2009). Quinoa—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(2), 71-79.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., & Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 461-469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.035>
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5), 840-846. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>
- Jemil, I., Abdelhedi, O., Nasri, R., Mora, L., Jridi, M., Aristoy, M. C., ... & Nasri, M. (2017). Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases. *Food Research International*, 100, 121-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.018>
- Jenne, D. E., & Tschopp, J. (1988). Granzymes: A family of serine proteases in granules of cytolytic T lymphocytes. *Cytotoxic Effector Mechanisms*, 33-47. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73911-8_4
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-calculated IR spectrum amide I, II, and III band contributions of N-methylacetamide fine components. *ACS Omega*, 5(15), 8572-8578.
- Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576-7583.
- Jiang, Y., Li, C., Nguyen, X., Muzammil, S., Towers, E., Gabrielson, J., & Narhi, L. (2011). Qualification of FTIR spectroscopic method for protein secondary structural analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 4631-4641. <https://doi.org/10.1002/jps.22686>
- Jin, D. X., Liu, X. L., Zheng, X. Q., Wang, X. J., & He, J. F. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.119>

- Jin, H. X., Xu, H. P., Li, Y., Zhang, Q. W., & Xie, H. (2019). Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang province in China. *Marine Drugs*, 17(3), 169. <https://doi.org/10.3390/md17030169>
- Johari, M. A., & Khong, H. Y. (2019). Total phenolic content and antioxidant and antibacterial activities of *Pereskia bleo*. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2019, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2019/7428593>
- Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M. H., & Henschen, A. (1978). Structural relatedness of κ -casein and fibrinogen γ -chain. *Journal of Molecular Evolution*, 11, 271-277. <https://doi.org/10.1007/BF01733837>
- Kamaoğlu, A. (2014). *Calchas nordmanni venomunda bulunan peptidlerin antibakteriyal aktivitesinin araştırılması* [Yüksek lisans tezi]. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.
- Kamran, F., Phillips, M., Harman, D. G., & Reddy, N. (2023). Antioxidant activities of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein hydrolysates and their potential for nutraceutical and functional foods. *Food Chemistry Advances*, 2, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100297>
- Karabak, S., Taşçı, R., Ceyhan, V., Özbek, K., & Arslan, H. Y. (2019). İhsangazi tarlalarından soframıza kültür mirası siyez buğdayı. *Toprak Su Dergisi*, 2019, 86-93. <https://doi.org/10.21657/topraksu.655281>
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742-2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
- Karami, Z., Butkinaree, C., Yingchutrakul, Y., Simanon, N., & Duangmal, K. (2022). Comparative study on structural, biological and functional activities of hydrolysates from Adzuki bean (*Vigna angularis*) and mung bean (*Vigna radiata*) protein concentrates using Alcalase and Flavourzyme. *Food Research International*, 161, 111797. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111797>
- Karami, Z., Peighambardoust, S. H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, 100450. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100450>
- Karimi, A., Azizi, M. H., & Ahmadi Gavlighi, H. (2020). Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: In vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Food Science & Nutrition*, 8(5), 2395-2405. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1529>
- Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.023>
- Keshapaga, U. R., Jathoth, K., Singh, S. S., Gogada, R., & Burgula, S. (2023). Characterization of high-yield *Bacillus subtilis* cysteine protease for diverse industrial applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(2), 739-752. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00992-6>

- Khan, Z. S., Amir, S., Sokač Cvetnić, T., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Jurina, T., & Gajdoš Kljusurić, J. (2023). Sustainable isolation of bioactive compounds and proteins from plant-based food (and byproducts). *Plants*, 12(16), 2904. <https://doi.org/10.3390/plants12162904>
- Khosravi, F., Azizi, Rabani, M., & Nadoshan, R. M. (2022). Assessment of the biotechnological activity of wheat hydrolysates prepared with the *Biarum bovei* extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(4), 2738-2748. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01379-1>
- Kılıç, M. (2010). *Antimikrobiyal peptitler ve glutatyon-s-transferaz izozimlerinin Tinea versicolor, Tinea inguinalis, Tinea pedis, Tinea corporis ve Candidal intertrigo infeksiyonlarındaki ekspresyonları* [Yüksek lisans tezi]. Kırıkkale Üniversitesi.
- Kim, E. K., Oh, H. J., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Ahn, C. B., Lee, J. S., ... & Park, P. J. (2013). Purification of a novel peptide derived from *Mytilus coruscus* and in vitro/in vivo evaluation of its bioactive properties. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1078-1084. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.013>
- Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Kim, S. S., Ahn, C. B., Moon, S. W., & Je, J. Y. (2018). Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Bioscience*, 25, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.010>
- Kimber, G. V., & Sears, E. R. (1987). Evolution in the genus *Triticum* and the origin of cultivated wheat. *Wheat and Wheat Improvement*, 13, 154-164. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr13.2ed.c6>
- Kishore, R. (2004). β -Ala containing peptides: Potentials in design and construction of bioactive peptides and protein secondary structure mimics. *Current Protein & Peptide Science*, 5, 435-455. <https://doi.org/10.2174/1389203043379396>
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323. <https://doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Kodama, T., Miyazaki, T., Kitamura, I., Suzuki, Y., Namba, Y., Sakurai, J., & Inoue, S. (2005). Effects of single and long-term administration of wheat albumin on blood glucose control: Randomized controlled clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 384-392. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602085>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101(2), 615-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.057>

- Kong, X., Zhou, H., Hua, Y., & Qian, H. (2008). Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *European Food Research and Technology*, 227, 511-517. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0749-y>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.002>
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), 1907-1915. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00995-0)
- Kumar, A., Rani, P., Purohit, S. R., & Rao, P. S. (2020). Effect of ultraviolet irradiation on wheat (*Triticum aestivum*) flour: Study on protein modification and changes in quality attributes. *Journal of Cereal Science*, 96, 103094. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103094>
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17(7), 561-594. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00027-0)
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>
- Kumar, D., Tarafdar, A., Dass, S. L., Pareek, S., & Badgujar, P. C. (2023). Antioxidant potential and amino acid profile of ultrafiltration derived peptide fractions of spent hen meat protein hydrolysate. *Journal of Food Science and Technology*, 60(3), 1195-1201. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05437-w>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., & Kennedy, J. F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>
- Kumari, D., Sharma, N., Pandove, G., & Achal, V. (2009). Alkaline protease production by immobilized cells of *Bacillus pumilis* MTCC 2296 in various matrices. *Life Science Journal*, 6, 8-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

- Lam, A. C. Y., Warkentin, T. D., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2017). Physicochemical and functional properties of protein isolates obtained from several pea cultivars. *Cereal Chemistry*, 94(1), 89-97. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-16-0097-FI>
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M. C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics*, 128, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.06.016>
- Lasztity, R. (1984). *The Chemistry of Cereal Proteins* (2nd ed.). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9780203737057>
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 950. <https://doi.org/10.3390/ijms17060950>
- Lermen, A. M., Clerici, N. J., Borchardt Maciel, D., & Daroit, D. J. (2022). Characterization and application of a crude bacterial protease to produce antioxidant hydrolysates from whey protein. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033997>
- Li, Y., Wang, H., Wang, L., Qiu, J., Li, Z., & Wang, L. (2023). Milling of wheat bran: Influence on digestibility, hydrolysis and nutritional properties of bran protein during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 404, 134559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134559>
- Liang, C. Y., & Marchessault, R. H. (1959). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses. *Journal of Polymer Science*, 37(132), 385-395. <https://doi.org/10.1002/pol.1959.1203713209>
- Ling, B., Ouyang, S., & Wang, S. (2019). Radio-frequency treatment for stabilization of wheat germ: Storage stability and physicochemical properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.002>
- Liu, F., Chen, Z., Shao, J., Wang, C., & Zhan, C. (2017). Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. *Food Bioscience*, 20, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.002>
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G. H., & Zhang, W. G. (2016). A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants*, 5(3), 32. <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
- Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102254. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>
- Liu, W. Y., Zhang, J. T., Miyakawa, T., Li, G. M., Gu, R. Z., & Tanokura, M. (2021). Antioxidant properties and inhibition of angiotensin-converting enzyme by highly active peptides from wheat gluten. *Scientific Reports*, 11(1), 5206. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84820-7>

- Løje, H., Møller, B., Laustsen, A. M., & Hansen, Å. (2003). Chemical composition, functional properties and sensory profiling of einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 37(2), 231-240. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0498>
- Lopes-da-Silva, J. A., & Monteiro, S. R. (2019). Gelling and emulsifying properties of soy protein hydrolysates in the presence of a neutral polysaccharide. *Food Chemistry*, 294, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.039>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein estimation by Lowry's method. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265.
- Lucena, G. N., dos Santos, C. C., Pinto, G. C., Piazza, R. D., Guedes, W. N., Júnior, M. J., & Marques, R. F. C. (2020). Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregate and its evaluation of the alternating magnetic field (AMF) effects in the catalytic activity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 516, 167326. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2020.167326>
- Lylloff, J. E., Hansen, L. B., Jepsen, M., Sanggaard, K. W., Vester, J. K., Enghild, J. J., & Glaring, M. A. (2016). Genomic and exoproteomic analyses of cold-and alkaline-adapted bacteria reveal an abundance of secreted subtilisin-like proteases. *Microbial Biotechnology*, 9(2), 245-256. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12343>
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 6-19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Madhavi, J., Srilakshmi, J., Rao, M. R., & Rao, K. R. S. S. (2011). Efficient leather dehairing by bacterial thermostable protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 3(1), 11-26.
- Mahdavi, A., Mirza Alizadeh, A., Azimzadeh, N., Moradpey, S., Abolhassani, M., Aminzare, M., & Barani-bonab, H. (2024). Technical characteristics and nutritional values of einkorn wheat: A literature review. *Journal of Human Environment and Health Promotion*, 10(3), 118-125.
- Maldonado, J., Gil, A., Narbona, E., & Molina, J. A. (1998). Special formulas in infant nutrition: A review. *Early Human Development*, 53, S23-S32. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(98\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(98)00062-0)
- Mallek-Ayadi, S., Bahloul, N., & Kechaou, N. (2018). Chemical composition and bioactive compounds of *Cucumis melo* L. seeds: Potential source for new trends of plant oils. *Process Safety and Environmental Protection*, 113, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.09.016>
- Manni, L., Misbah, A., Zouine, N., & Ananou, S. (2020). Biochemical characterization of a novel alkaline and detergent stable protease from *Aeromonas veronii* OB3. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 48, 352-359. <https://doi.org/10.4014/mbl.1912.12015>
- Mansour, S. C., Pena, O. M., & Hancock, R. E. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends in Immunology*, 35(9), 443-450.

- Maqsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., & Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalase hydrolysed pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*, 116, 905-915. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.027>
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177-184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Matsui, T., Li, C. H., & Osajima, Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal of Peptide Science*, 5(7), 289-297.
- Matsui, T., Yuki Yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H., & Matsumoto, K. (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(2), 80-86. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00198-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00198-X)
- Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*, 15(5), 218. <https://doi.org/10.22122/arya.v15i5.1755>
- McCue, J. T. (2009). Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods in Enzymology*, 463, 405-414. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63025-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63025-1)
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014). Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties. *The FEBS Journal*, 281(2), 583-592. <https://doi.org/10.1111/febs.12530>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS Journal*, 290(9), 2214-2231. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>
- McGeagh, J. D., Ranaghan, K. E., & Mulholland, A. J. (2011). Protein dynamics and enzyme catalysis: Insights from simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(8), 1077-1092. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.12.002>
- Meinlschmidt, P., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2016). Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.026>
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21(1-4), 55-61. <https://doi.org/10.1002/biof.552210111>
- Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 27-31. <https://doi.org/10.1017/S000711450000221X>
- Meisel, H., & Olieman, C. (1998). Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 372(1-2), 291-297. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00335-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00335-3)

- Meisel, H., & Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 41-43. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(90\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0924-2244(90)90029-X)
- Merlino, M., Leroy, P., Chambon, C., & Branlard, G. (2009). Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(7), 1321-1337. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0983-8>
- Mildner, A. M., Rothrock, D. J., Leone, J. W., Bannow, C. A., Lull, J. M., Reardon, I. M., & Tomich, C. S. C. (1994). The HIV-1 protease as enzyme and substrate: Mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. *Biochemistry*, 33(32), 9405-9413. <https://doi.org/10.1021/bi00198a005>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(23), 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., & Aminlari, M. (2018). Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 696-705. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.008>
- Moghadam, M., Salami, M., Mohammadian, M., Emam-Djomeh, Z., Jahanbani, R., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2020). Physicochemical and bio-functional properties of walnut proteins as affected by trypsin-mediated hydrolysis. *Food Bioscience*, 36, 100611. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100611>
- Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, 344-349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757-1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Morris, C. F. (2002). Puroindolines: The molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology*, 48(5), 633-647. <https://doi.org/10.1023/A:1014837431178>
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- Muneer, R., Hashmet, M. R., Pourafshary, P., & Shakeel, M. (2023). Unlocking the power of artificial intelligence: Accurate zeta potential prediction using machine learning. *Nanomaterials*, 13(7), 1209. <https://doi.org/10.3390/nano13071209>
- Najafian, L., & Babji, A. S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification of antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 9, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.003>

- Nakov, G., Brandolini, A., Ivanova, N., Dimov, I., & Stamatovska, V. (2018). The effect of einkorn (*Triticum monococcum* L.) whole meal flour addition on physico-chemical characteristics, biological active compounds and in vitro starch digestion of cookies. *Journal of Cereal Science*, 83, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.004>
- Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Datta, G., Garber, D., & Fogelman, A. M. (2004). Human apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: Potential for atherosclerosis reversal. *Current Opinion in Lipidology*, 15, 645-649.
- Navab, M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Anantharamaiah, G. M., & Fogelman, A. M. (2009). The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *The Journal of Lipid Research*, 50, S145-S149.
- Nduka, O. (2007). *Modern industrial microbiology and biotechnology: Biocatalysts: immobilized enzymes and immobilized cells*.
- Neog, P. R., Saini, S., & Konwar, B. K. (2024). Purification, and characterization of detergent-compatible serine protease from *Bacillus safensis* strain PRN1: A sustainable alternative to hazardous chemicals in detergent industry. *Protein Expression and Purification*, 219, 106479. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106479>
- Ngoh, Y. Y., & Gan, C. Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331-337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.120>
- Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, 83, 317-331. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1067-3>
- Niazi, A., & Torabizadeh, H. (2022). Functional properties and emulsion stability of wheat gluten hydrolysates produced by endopeptidases from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 5(1), 76-85. <https://doi.org/10.22059/jfabe.2022.338961.1110>
- Nimalaratne, C., Bandara, N., & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467-472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.014>
- Nirmal, N. P., Santivarangkna, C., Rajput, M. S., Benjakul, S., & Maqsood, S. (2022). Valorization of fish byproducts: Sources to end-product applications of bioactive protein hydrolysate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1803-1842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12917>
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>

- Noptana, R., McClements, D. J., McLandsborough, L. A., & Onsaard, E. (2024). Comparison of characteristics and antioxidant activities of sesame protein hydrolysates and their fractions. *Heliyon*, 10(6).
- Nor Mohamadi, E., Sadeghi Mahonaki, A., Shahrampoor, D., & Khamiri, M. (2017). The investigation on the anti-bacterial power of bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) oil cake protein. *Journal of Food Microbiology*, 4(2), 71-82.
- Nordström, R., Nyström, L., Andrén, O. C., Malkoch, M., Umerska, A., Davoudi, M., ... & Malmsten, M. (2018). Membrane interactions of microgels as carriers of antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 513, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.11.014>
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4), 485-493. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00476-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00476-4)
- Oberg, K. A., Ruysschaert, J. M., & Goormaghtigh, E. (2004). The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra. *European Journal of Biochemistry*, 271(14), 2937-2948. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04220.x>
- Oboh, G., Ademiluyi, A. O., & Akindahunsi, A. A. (2009). Changes in polyphenols distribution and antioxidant activity during fermentation of some underutilized legumes. *Food Science and Technology International*, 15(1), 41-46. <https://doi.org/10.1177/1082013208101022>
- O'Keeffe, M. B., Conesa, C., & FitzGerald, R. J. (2017). Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(8), 1751-1759. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13448>
- Olagunju, A. I., Omoba, O. S., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2018). Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. *LWT*, 97, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.003>
- Olanca, B., & Özey, D. S. (2010). Preparation and functional properties of gluten hydrolysates with wheat-bug (*Eurygaster* spp.) protease. *Cereal Chemistry*, 87(6), 518-523. <https://doi.org/10.1094/CCEM-02-10-0026>
- Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., & DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.05.001>
- Olivera, N. L., Sequeiros, C., Iglesias, M., & Nievas, M. (2021). Proteomic analysis and optimized production of *Alkalihalobacillus patagoniensis* PAT 05 T extracellular proteases. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 225-234. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02436-z>

- Olubunmi, I. P., Olajumoke, A. A., Bamidele, J. A., & Omolara, O. F. (2019). Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of golden melon (*Cucumis melo* L.) seeds for functional food application. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 25(2), 1-13.
- Onsaard, W., Kate-Ngam, S., & Onsaard, E. (2023). Physicochemical and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates obtained from different proteases. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2374-2385. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01796-2>
- Osukoya, O., Nwoye-Ossy, M., Olayide, I., Ojo, O., Adewale, O., & Kuku, A. (2020). Antioxidant activities of peptide hydrolysates obtained from the seeds of *Treculia africana* Decne (African breadfruit). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(5), 504-510. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1709980>
- Oszvald, M., Tamas, L., Shewry, P. R., & Tosi, P. (2014). The trafficking pathway of a wheat storage protein in transgenic rice endosperm. *Annals of Botany*, 113(5), 807-815. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu008>
- Ouellette, R. J. (1998). *Organic Chemistry: A Brief Introduction*. Prentice Hall.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. Elsevier.
- Panayotova, T., Pashova-Baltova, K., & Dimitrov, Z. (2018). Production of ACE-inhibitory peptides in milk fermented with selected lactic acid bacteria. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 7(1), 31-37.
- Parhizkari, K., Hosseini, E., & Sharifi, A. (2019). Investigation of Properties of Bioactive Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysis of Chicken Slaughter Waste. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 49(4), 589-596. <https://doi.org/10.22059/ijbse.2018.243764.664999>
- Park, S. Y., Kim, Y. S., Ahn, C. B., & Je, J. Y. (2016). Partial purification and identification of three antioxidant peptides with hepatoprotective effects from blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate by peptic hydrolysis. *Journal of Functional Foods*, 20, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.023>
- Parker, F. (1971). *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*. Boston: Springer.
- Pathak, A. P., & Deshmukh, K. B. (2012). Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A Lonar soda lake isolate.
- Payne, K. J., & Veis, A. (1988). Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 27(11), 1749-1760. <https://doi.org/10.1002/bip.360271105>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>

- Perçin, P. S., & Karakaya, S. (2020). Evaluation of protein profiles, bioactivity, allergenicity and toxicity of peptides generated after in silico digestion of common wheat and einkorn wheat. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(4), 901-911. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i4.901-911.3072>
- Phongthai, S., D'Amico, S., Schoenlechner, R., Homthawornchoo, W., & Rawdkuen, S. (2018). Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 240, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.080>
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10), 347-356. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6)
- Piperno, D. R., Weiss, E., Holst, I., & Nadel, D. (2004). Processing of wild cereal grains in the Upper Palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature*, 430(7000), 670-673. <https://doi.org/10.1038/nature02734>
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Science and Technology*, 34, 441-448. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6349>
- Pomeranz, Y. (1988). Chemical composition of kernel structures. *Wheat Chemistry and Technology* (3. Baskı, ss. 97-158) içinde. American Association of Cereal Chemists.
- Prakasham, R. S., Rao, C. S., & Sarma, P. N. (2006). Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 97(13), 1449-1454. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.015>
- Prasad, R., Nair, A. J., & Abraham, T. K. (2017). Purification and Characterization of Alkaline Metalloprotease from *Bacillus* sp. MTCC 9558 and its Application in Bioactive Peptide Production. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 11(1), 187-196. <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.11.1.24>
- Provansal, M. M., Cuq, J. L., & Cheftel, J. C. (1975). Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid crosslinks and isomerization of lysine residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(5), 938-943. <https://doi.org/10.1021/jf60201a030>
- Pusztai, A. (1972). Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germinating seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta*, 107, 121-129. <https://doi.org/10.1007/BF00387718>
- Qu, J., Zhang, M., Hong, T., Xu, X., & Xu, D. (2023). Improvement of adzuki bean paste quality by Flavourzyme-mediated enzymatic hydrolysis. *Food Bioscience*, 51, 102205. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102205>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservatives to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>

- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.005>
- Rajendhran, H. P., Vaidyanathan, V. K., Venkatraman, S., & Karthik, P. (2024). Optimization of enzymatic hydrolysis by protease produced from *Bacillus subtilis* MTCC 2423 to improve the functional properties of wheat gluten hydrolysates. *International Journal of Food Science*, 2024(1), 5053510. <https://doi.org/10.1155/2024/5053510>
- Rajesh, B. M., & Iqbal, J. (2006). Recent advances in the synthesis of some bioactive peptides and peptidomimetics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 247-259. <https://doi.org/10.2174/138920106777950807>
- Raji, O. H., & Orelaja, O. T. (2014). Nutritional composition and oil characteristics of golden melon (*Cucumis melo*) seeds. *Food Science and Quality Management*, 27, 18-21.
- Ramalingam, K., Nandhi, P., Murugan, R., & Venkatesan, R. (2022). Physical and chemical characterization of alkaline protease from *Bacillus subtilis* Vbc7 using agro waste as substrate: Characterization of alkaline protease. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, e5301. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5301>
- Ramalingum, N., Bhagwat, P., Permaul, K., & Pillai, S. (2024). Production, characterization, and application of *Pseudomonas aeruginosa* S-04 keratinase for feather utilization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(10), 11683-11695. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03218-1>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536-547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Rees, O. J. (2010). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Developments, Techniques, and Applications*. New York: Nova Science Publishers.
- Ren, L., Fan, J., Yang, Y., Xu, Y., Chen, F., Bian, X., & Zhang, N. (2021). Enzymatic hydrolysis of broken rice protein: Antioxidant activities by chemical and cellular antioxidant methods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 788078. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.788078>
- Roettger, B. F., & Ladisch, M. R. (1989). Hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology Advances*, 7(1), 15-29. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(89\)90901-4](https://doi.org/10.1016/0734-9750(89)90901-4)

- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., ... & García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.002>
- Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., & Prangdimurti, E. (2019). Production of antihypertensive bioactive peptides in fermented food by lactic acid bacteria-- a review. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 11(4), 29-44. <https://doi.org/10.34302/2019.11.4.3>
- Ruh, E. (2012). *Bazı antimikrobiyal peptidlerin Plasmodium falciparum'a karşı etkinliğinin in vitro olarak saptanması* [Doktora tezi]. Hacettepe Üniversitesi.
- Rutherford, K. J., & Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 99-102. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002312>
- Sahu, R., Sooram, B., Sasidharan, S., Nag, N., Tripathi, T., & Saudagar, P. (2023). Applications of infrared spectroscopy to study proteins. In P. Saudagar & T. Tripathi (Eds.), *Advanced Spectroscopic Methods to Study Biomolecular Structure and Dynamics* (pp. 153-171). Cambridge, USA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99127-8.00005-2>
- Saladino, R. (2012). Advances in the synthesis of bioactive unnatural amino acids and peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 277-300. <https://doi.org/10.2174/138955712799829276>
- Sales, P. M. D., Souza, P. M. D., Simeoni, L. A., Batista, P. D. O. M. D., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant sources.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Mata-Haro, V., & González-Córdova, A. F. (2016). Food-derived immunomodulatory peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(11), 3631-3641. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7697>
- Sarıakçalı, B. (2019). *Mikrobiyal fermentasyon yöntemi ile anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü peptit üretimi* [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Sarker, A., Chakraborty, S., & Roy, M. (2020). Dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates inhibit the growth of oxidizing substances in plain yogurt. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100062. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100062>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>

- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., & Rackis, J. J. (1984). Dry beans of *Phaseolus*: A review. Part 1. Chemical composition: Proteins. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 20(1), 1-46. <https://doi.org/10.1080/10408398409527382>
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G. D., Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36, 375-381. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.000216>
- Schmelzer, C. E., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H., & Raith, K. (2007). Peptic digestion of β -casein: Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*, 1166(1-2), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.015>
- Segura, R., & Ventura, J. L. (1988). Effect of L-tryptophan supplementation on exercise performance. *International Journal of Sports Medicine*, 9(05), 301-305. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1024931>
- Senadheera, T. R., Hossain, A., Dave, D., & Shahidi, F. (2023). Functional and physiochemical properties of protein isolates from different body parts of North Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Food Bioscience*, 52, 102511. <https://doi.org/10.3390/molecules28135263>
- Seyedain-Ardabili, M., Azizi, M. H., & Salami, M. (2023). Evaluation of antioxidant, α -amylase inhibitory, and antimicrobial activities of wheat gluten hydrolysates produced by ficin protease. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17, 2892–2903. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01829-4>
- Shaikh, I. A., Turakani, B., Malpani, J., Goudar, S. V., Mahnashi, M. H., Al-Serwi, R. H., & Iqbal, S. S. (2023). Extracellular protease production, optimization, and partial purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its applications. *Journal of King Saud University-Science*, 35(1), 102429. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>
- Sharma, S., Pradhan, R., Manickavasagan, A., Tsopmo, A., Thimmanagari, M., & Dutta, A. (2023). Corn distillers solubles by two-step proteolytic hydrolysis as a new source of plant-based protein hydrolysates with ACE and DPP4 inhibition activities. *Food Chemistry*, 401, 134120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134120>
- Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: A review. *International Journal of Bioautomation*, 15(4), 223-250.
- Shewry, P. (2019). What is gluten—why is it special? *Frontiers in Nutrition*, 6, 101. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00101>
- Shimelis, E. A., & Rakshit, S. K. (2005). Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *LWT-Food Science and Technology*, 38(4), 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.002>

- Shu, G., Zhang, B., Zhang, Q., Wan, H., & Li, H. (2016). Effect of temperature, pH, enzyme to substrate ratio, substrate concentration and time on the antioxidative activity of hydrolysates from goat milk casein by alcalase. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 20(2), 29-38.
- Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., & Iwan, M. (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 19(4), 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.011>
- Simonetti, A., Perna, A., & Gambacorta, E. (2017). Dairy products as source of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory (ACE-I) peptides. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 9(3). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000e131>
- Singh, U., Kaur, D., Mishra, V., & Krishania, M. (2022). Combinatorial approach to prepare antioxidative protein hydrolysate from corn gluten meal with dairy whey: Preparation, kinetics, nutritional study and cost analysis. *LWT*, 153, 112437. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112437>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Sirtori, C. R., Galli, C., Anderson, J. W., & Arnoldi, A. (2009). Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, 203(1), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.019>
- Skrabanja, V., Kreft, I., Golob, T., Modic, M., Ikeda, S., Ikeda, K., & Kosmelj, K. (2004). Nutrient content in buckwheat milling fractions. *Cereal Chemistry*, 81(2), 172-176. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.2.172>
- Smidsrød, O., & Skja, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)
- Soria-Hernández, C., Serna-Saldívar, S., & Chuck-Hernández, C. (2015). Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 269-277. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.03.15.3920>
- Sotoudeh, B., & Azizi, M. H. (2024). Production of bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive activities from wheat gluten using *Withania coagulans*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(3), 2101-2109. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02299-4>
- Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2021). Recent developments on production, purification and biological activity of marine peptides. *Food Research International*, 147, 110468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110468>
- StraPep (2020, 2 Eylül). A Structure Database of Bioactive Peptides. <http://isyslab.info/StraPep/index.php> adresinden 10 Eylül 2024 tarihinde alınmıştır.

- Su, S., Wan, Y., Guo, S., Zhang, C., Zhang, T., & Liang, M. (2018). Effect of peptide–phenolic interaction on the antioxidant capacity of walnut protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(2), 508-515. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13610>
- Supawong, S., Park, J. W., & Thawornchinsombut, S. (2019). Effect of rice bran hydrolysates on physicochemical and antioxidative characteristics of fried fish cakes during repeated freeze-thaw cycles. *Food Bioscience*, 32, 100471. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100471>
- Susi, H., & Byler, D. M. (1983). Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: Second derivative spectra. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115(1), 391-397. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91016-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91016-1)
- Şahin, Y., & Karakas, F. P. (2022). Chemical composition of einkorn (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*), emmer (*Triticum dicoccum*), and spelt (*Triticum spelta*). In *Ancient Wheats* (pp. 119-145). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07285-7_6
- Şanlıdere-Aloğlu, H. (2010). *Yoğurttan biyoaktif peptit eldesi ve bu peptitlerin antimikrobiyel ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi* [Doktora tezi]. Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Tadros, T. F. (2009). Emulsion science and technology: A general introduction. *Emulsion Science and Technology*, 1(1), 1-55. <https://doi.org/10.1002/9783527626564>
- Takahashi, K., Chang, W. C., Takahashi, M., Pavlov, V., Ishida, Y., La Bonte, L., & Van Cott, E. M. (2011). Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology*, 216(1-2), 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.02.005>
- Tang, C. H., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114(4), 1484-1490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.049>
- Tang, S., Li, J., Huang, G., & Yan, L. (2021). Predicting protein surface property with its surface hydrophobicity. *Protein and Peptide Letters*, 28(8), 938-944. <https://doi.org/10.2174/0929866528666210222160603>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S., & Vardhanabhuti, B. (2016). Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, 69, 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.04.011>
- Tian, S., Meng, F., Du, K., & Chen, Y. (2023). Biological activity evaluation and identification of different molecular weight peptides from wheat germ albumin. *LWT*, 189, 115556. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115556>

- Tomaz, C. T. (2017). Hydrophobic interaction chromatography. In *Liquid Chromatography* (pp. 171-190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00007-5>
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., & Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74(12), 4137-4142. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78608-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78608-6)
- Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M., & Kato, N. (2002). Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2125-2129.
- Tsugita, A., & Scheffler, J. J. (1982). A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *European Journal of Biochemistry*, 124(3), 585-588. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06634.x>
- Tu, M., Feng, L., Wang, Z., Qiao, M., Shahidi, F., Lu, W., & Du, M. (2017). Sequence analysis and molecular docking of antithrombotic peptides from casein hydrolysate by trypsin digestion. *Journal of Functional Foods*, 32, 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.015>
- Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004>
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., & Balasubramanian, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), 343-353. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.04.006>
- United States Department of Agriculture (2024, 10 Eylül). <https://fdc.nal.usda.gov/food-search?type=Foundation&query= adresinden> 10 Eylül 2024 tarihinde alınmıştır.
- Unnikrishnan, P., Puthenveetil Kizhakkethil, B., Anant Jadhav, M., Sivam, V., Ashraf, P. M., Ninan, G., & Aliyamveetil Abubacker, Z. (2020). Protein hydrolysate from yellowfin tuna red meat as fortifying and stabilizing agent in mayonnaise. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 413-425. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04069-x>
- Uraipong, C., & Zhao, J. (2016). Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α -amylase, β -glucosidase and ACE-inhibition activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1101-1110. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7182>
- Usoltsev, D., Sitnikova, V., Kajava, A., & Uspenskaya, M. (2019). Systematic FTIR spectroscopy study of the secondary structure changes in human serum albumin under various denaturation conditions. *Biomolecules*, 9(8), 359. <https://doi.org/10.3390/biom9080359>

- Ünal, M. Ü., Şener, A., & Cemek, K. (2018). Biyoaktif peptitlerin sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, 43(6), 930-942. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18048>
- Vallath, A., & Shanmugam, A. (2022). Study on model plant-based functional beverage emulsion (non-dairy) using ultrasound—A physicochemical and functional characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 88, 106070. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106070>
- Van Lancker, F., Adams, A., & De Kimpe, N. (2011). Chemical modifications of peptides and their impact on food properties. *Chemical Reviews*, 111, 7876–7903. <https://doi.org/10.1021/cr200032j>
- Vásquez-Villanueva, R., Marina, M. L., & García, M. C. (2016). Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues. *Journal of Chromatography A*, 1428, 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.032>
- Villanueva-Lazo, A., Paz, S. M. D. L., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., Carrera, C., Pedroche, J. J., & Millan-Linares, M. D. C. (2021). Antihypertensive and antioxidant activity of chia protein techno-functional extensive hydrolysates. *Foods*, 10(10), 2297. <https://doi.org/10.3390/foods10102297>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2021). Production of pulse protein ingredients and their application in plant-based milk alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.090>
- Wang, C., Yu, S., Song, T., He, T., Shao, H., & Wang, H. (2016). Extracellular proteome profiling of *Bacillus pumilus* SCU11 producing alkaline protease for dehairing. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 1993-2005. <https://doi.org/10.4014/jmb.1602.02042>
- Wang, J., Wang, T., Yu, G., Li, X., Liu, H., Liu, T., & Zhu, J. (2022). Effect of enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsification properties of rice bran albumin and globulin fractions. *LWT*, 156, 113005. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113005>
- Wang, J., Yin, T., Xiao, X., He, D., Xue, Z., Jiang, X., & Wang, Y. (2018). StraPep: a structure database of bioactive peptides. *Database*, 2018, bay038.
- Wang, J., Zhao, M., Yang, X., & Jiang, Y. (2006). Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 44(1), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.04.002>
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.033>
- Wang, Y. Y., Wang, C. Y., Wang, S. T., Li, Y. Q., Mo, H. Z., & He, J. X. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. *Food Chemistry*, 345, 128765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765>

- Watson, P. J., & Tuzinski, P. A. (1989). Study of zeta potential for material particles in chemical additive solutions. *Bureau of Mines Information Circular*. Washington, USA: US Department of the Interior.
- Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. S., & Stevens, J. F. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*, 192, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.057>
- Wijngaard, H. H., & Arendt, E. K. (2006). Buckwheat. *Cereal Chemistry*, 83(4), 391-401. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0391>
- Worsztynowicz, P., Białas, W., & Grajek, W. (2020). Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 312, 126035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126035>
- Wouters, A. G., Rombouts, I., Schoebrechts, N., Fierens, E., Brijs, K., Blecker, C., & Delcour, J. A. (2017). Foam fractionation as a tool to study the air-water interface structure-function relationship of wheat gluten hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.031>
- Wu, R., Chen, L., Liu, D., Huang, J., Zhang, J., Xiao, X., ... & He, H. (2017). Preparation of antioxidant peptides from salmon byproducts with bacterial extracellular proteases. *Marine Drugs*, 15(1), 4. <https://doi.org/10.3390/md15010004>
- Wu, W., He, L., Liang, Y., Yue, L., Peng, W., Jin, G., & Ma, M. (2019). Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis. *Food Chemistry*, 284, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.103>
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509-1518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.063>
- Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities, and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chemistry*, 270, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.103>
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.078>
- Xu, X., Qiao, Y., Shi, B., & Dia, V. P. (2021). Alcalase and bromelain hydrolysis affected physicochemical and functional properties and biological activities of legume proteins. *Food Structure*, 27, 100178. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100178>

- Xu, Y., Yang, Y., Ma, C. M., Bian, X., Liu, X. F., Wang, Y., & Zhang, N. (2023). Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. *Food Research International*, 173, 113473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113473>
- Yaghoobzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., & Fattahi, E. (2020). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 625-632. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09869-5>
- Yamaguchi, M. (1992). Determination of the nitrogen-to-protein conversion factor in cereals. In *Seed Analysis* (pp. 95-107). https://doi.org/10.1007/978-3-662-01639-8_5
- Yaman, H. M., Ordu, B., Zencirci, N., & Kan, M. (2020). Coupling socioeconomic factors and cultural practices in production of einkorn and emmer wheat species in Turkey. *Environment, Development and Sustainability*, 22, 8079-8096. <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00562-7>
- Yang, J., Liu, G., Zeng, H., & Chen, L. (2018). Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 83, 275-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.020>
- Yang, S., Hou, Y., Huang, J., Zhang, Q., Liao, A., Shen, X., & Lu, M. (2023). Preparation, structural characterization, and functional properties of a novel selenium-chelating peptide derived from the hydrolysate of wheat protein. *International Journal of Food Properties*, 26(2), 3241-3260. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2270726>
- Yang, X. R., Zhang, L., Ding, D. G., Chi, C. F., Wang, B., & Huo, J. C. (2019). Preparation, identification, and activity evaluation of eight antioxidant peptides from protein hydrolysate of hairtail (*Trichiurus japonicas*) muscle. *Marine Drugs*, 17(1), 23. <https://doi.org/10.3390/md17010023>
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö., & Akbulut, N. (2011). Süt kaynaklı biyoaktif peptitler ve fonksiyonel özellikleri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 48(1), 77-84.
- Yılmaz, G. (2010). *Biyomedikal implantlarda antimikrobiyal aktiviteyi kontrol etmeye yönelik füzyon peptitler* [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Yi, J., De Gobba, C., Skibsted, L. H., & Otte, J. (2017). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1129-1144. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203932>
- Yoshikawa, M., Tani, F., Yoshimura, T., & Chiba, H. (1986). Opioid peptides from milk proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(9), 2419-2421. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867763>
- Yu, J., & Mikiashvili, N. (2020). Effectiveness of different proteases in reducing allergen content and IgE-binding of raw peanuts. *Food Chemistry*, 307, 125565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125565>

- Yüksel, D. (2018). *Farklı tekniklerle üretilen Maraş tarhanalarındaki biyoaktif peptitlerin belirlenmesi* [Yüksek lisans tezi]. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi.
- Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2014). Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): the long life of a founder crop of agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61, 677-706. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0084-7>
- Zaky, A. A., Chen, Z., Liu, Y., Li, S., & Jia, Y. (2019). Preparation and assessment of bioactive extracts having antioxidant activity from rice bran protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2542-2548. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00174-9>
- Zambare, V., Nilegaonkar, S., & Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, 28(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.002>
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., & Trziszka, T. (2013). Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44, 315-320. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1379-7>
- Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M., & Yu, G. (2019). Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. *Journal of Cereal Science*, 85, 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.001>
- Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul Hamid, A., Anwar, F., & Saari, N. (2012). Production of defatted palm kernel cake protein hydrolysate as a valuable source of natural antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8097-8111. <https://doi.org/10.3390/ijms13078097>
- Zeeshan, F., Tabbassum, M., Jorgensen, L., & Medlicott, N. J. (2018). Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy as an analytical method to investigate the secondary structure of a model protein embedded in solid lipid matrices. *Applied Spectroscopy*, 72(2), 268-279. <https://doi.org/10.1177/0003702817739908>
- Zhang, M., & Mu, T. H. (2017). Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.001>
- Zhang, Q., Tong, X., Li, Y., Wang, H., Wang, Z., Qi, B., ... & Jiang, L. (2019a). Purification and characterization of antioxidant peptides from alcalase-hydrolyzed soybean (*Glycinemax* L.) hydrolysate and their cytoprotective effects in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(20), 5772-5781. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01235>
- Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., & Wang, Z. (2009). Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.005>

- Zhang, X., Cao, D., Sun, X., Sun, S., & Xu, N. (2019b). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis*. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2585-2596. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1746-9>
- Zhang, X., Huang, Y., Ma, R., Tang, Y., Li, Y., & Zhang, S. (2023). Structural properties and antioxidant activities of soybean protein hydrolysates produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell envelope proteinase. *Food Chemistry*, 410, 135392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135392>
- Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhao, R., Lu, S., Li, S., Shen, H., Wang, Y., Gao, Y., & Li, J. (2024). Enzymatic preparation and processing properties of DPP-IV inhibitory peptides derived from wheat gluten: Effects of pretreatment methods and protease types. *Foods*, 13(2), 216. <https://doi.org/10.3390/foods13020216>
- Zheng, Z., Li, J., & Liu, Y. (2020). Effects of partial hydrolysis on the structural, functional, and antioxidant properties of oat protein isolate. *Food & Function*, 11(4), 3144-3155. <https://doi.org/10.1039/C9FO01783F>
- Zheng, Z., Li, J., Li, J., Sun, H., & Liu, Y. (2019). Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes. *Food Hydrocolloids*, 97, 105222. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105222>
- Zhou, D. Y., Zhu, B. W., Qiao, L., Wu, H. T., Li, D. M., Yang, J. F., & Murata, Y. (2012). In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. *Food and Bioprocess Technology*, 90(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.02.002>
- Zhou, H., Safdar, B., Li, H., Yang, L., Ying, Z., & Liu, X. (2023a). Identification of a novel α -amylase inhibitory activity peptide from quinoa protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 403, 134434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134434>
- Zhou, K., Slavin, M., Lutterodt, H., Whent, M., Eskin, N. M., & Yu, L. (2013). Cereals and legumes. In *Biochemistry of Foods* (pp. 3-48). Academic Press.
- Zhou, W., Zeng, S., Yu, J., Xiang, J., Zhang, F., Takriff, M. S., & Zhou, X. (2023b). Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* NWMCC0046, a candidate for the laundry industry. *Journal of Basic Microbiology*, 63(2), 223-234. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200528>
- Zhu, B., Chen, Y., & Wei, N. (2019). Engineering biocatalytic and biosorptive materials for environmental applications. *Trends in Biotechnology*, 37(6), 661-676. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.005>

- Zhu, H., Wang, L., Li, X., Shi, J., Scanlon, M., Xue, S., & Vafaei, N. (2024). Canola seed protein: Pretreatment, extraction, structure, physicochemical and functional characteristics. *Foods*, 13(9), 1357. <https://doi.org/10.3390/foods13091357>
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296-1302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029>
- Ziegler, E., & Greer, E. N. (1971). Wheat: Chemistry and Terminology.
- Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT*, 91, 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058>
- Žilić, S., Barać, M., Pešić, M., Hadži-Tašković-Šukalović, V., Dodig, D., Mladenović-Drinić, S., & Janković, M. (2011). Genetic variability of albumin-globulin content, and lipoxygenase and peroxidase activities among bread and durum wheat genotypes. *Genetika*, 43(3), 503-516. <https://doi.org/10.2298/GENSR1103503Z>
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>



EKLER

EK A. Tablolar



EK A

Tablo A.1. *Bacillus* sp. EBTA7 tarafından üretilen ham proteazın farklı pH ve sıcaklıkta elde edilen proteaz aktivitesi değerleri.

pH	Proteaz aktivitesi (U/mL)			
	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
7	1173 ± 27 ^c	1391 ± 71 ^c	745 ± 18 ^a	603 ± 38 ^a
8	1432 ± 23 ^b	1915 ± 8 ^{ab}	759 ± 64 ^a	545 ± 38 ^a
9	1560 ± 20 ^a	2056 ± 73 ^a	709 ± 50 ^a	602 ± 3 ^a
10	1469 ± 21 ^{ab}	1763 ± 119 ^b	773 ± 33 ^a	594 ± 29 ^a
11	1273 ± 95 ^c	1728 ± 54 ^b	713 ± 39 ^a	519 ± 53 ^a

*Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$).

Tablo A.2. Farklı proteazlar kullanılarak iki farklı enzim/substrat oranında elde edilen siyez unu hidrolizatlarının hidroliz derecesi ve protein içeriği.

	A1	A2	F1	F2	N1	N2	T1	T2	B1	B2
% HD	13,7 ± 0,1 ^E	35,6 ± 1,1 ^A	18,3 ± 0,3 ^D	27,9 ± 0,6 ^B	24,1 ± 0,8 ^C	27,4 ± 0,6 ^B	9,0 ± 0,3 ^G	7,5 ± 0,2 ^{GH}	6,0 ± 0,0 ^H	11,2 ± 0,3 ^F
% Protein	14,8 ± 0,1 ^F	23,9 ± 0,3 ^C	17,6 ± 0,3 ^E	21,2 ± 0,2 ^D	20,3 ± 0,0 ^D	21,4 ± 0,4 ^D	12,8 ± 0,0 ^G	12,6 ± 0,1 ^G	35,8 ± 1,1 ^B	38,4 ± 0,8 ^A

*Aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ($n=3$). (Ham protein içeriği kuru madde bazında verilmiş ve N-dönüşüm faktörü 5,7 alınmıştır.)

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fikriye Alev AKÇAY

ÖĞRENİM DURUMU:

- Lisans** : 2014, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- Yükseklisans** : 2017, Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı

MESLEKİ DENEYİM:

Pozisyon	Çalışma yeri	Tarih
Ziyaretçi araştırmacı (TÜBİTAK 2214-A Doktora bursiyeri)	Alberta Üniversitesi, Tarım, Yaşam ve Çevre Bilimleri Fakültesi, Tarım, Gıda ve Beslenme Bilimleri Bölümü, Bitkisel Protein ve Teknoloji Laboratuvarı, Edmonton, Kanada	2023 Haziran-2024 Haziran (12 ay)
ERASMUS+ Öğrenci Staj Hareketliliği bünyesinde yaz dönemi stajyeri	Algarve Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Fakültesi, Gıda Bilimleri Laboratuvarı, Faro, Portekiz	2019 Mayıs-2019 Temmuz (2 ay)
ERASMUS+ Eğitim Alma Personel Hareketliliği bünyesinde gözlemci	Napoli Federico II Üniversitesi, Eczacılık Bölümü, Napoli, İtalya	8-12 Mayıs 2023 (5 gün)
Araştırma görevlisi	Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye	2016 Ocak-Devam ediyor

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

Akçay, F. A., ve Avcı, A. (2024). Direct hydrolysis of einkorn whole grain flour proteins for the generation of bioactive peptides using various proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 275, 133565. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133565>

DİĞER ESERLER:

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Hamk, M., Akçay, F. A., & Avcı, A. (2023). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Bacillus subtilis* ZBP4 and Their Antibacterial Potential Against Foodborne Pathogens. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53(3), 255-264. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2076243>
- Avcı, A., Değirmen, M., Akçay, F.A. (2022). Investigation of Lentil Flour Utilization for the Production of Protease by *Bacillus subtilis* ZBP4. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(1), 75-81. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1870109>
- Avcı, A., Demir, S., Akçay, F.A. (2021). Production, Properties and Some Applications of Protease from Alkaliphilic *Bacillus* sp. EBTA6. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 803-810. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1858429>
- Akçay, F.A., Avcı, A. (2020). Effects of Process Conditions and Yeast Extract on the Synthesis of Selenium Nanoparticles by a Novel Indigenous Isolate *Bacillus* sp. EKT1 and Characterization of Nanoparticles. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2233-2243. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01942-8>
- Yurtluk, T., Akçay, F.A. and Avcı, A. (2018). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Novel *Bacillus* sp. SBT8. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2(48), 151-159. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1421963>

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Akçay, F.A., ve Avcı, A. (2020). Screening and Selection of Media Components for Protease Production by *Bacillus* sp. EBTA6 Using Plackett–Burman Design. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(6), 1250-1255. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i6.1250-1255.2986>
- Avcı, A., Akçay, F.A., Can, C. and Demir, S. (2019). Determination of Some Properties of Tarhanas Produced by Using Corn Flour and Kefir. *Food and Health*, 5(3), 168-174. <https://doi.org/10.3153/FH19018>
- Akçay, F.A. and Avcı, A. (2018). Synthesis of Metal Nanoparticles by Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(4), 408-414. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i4.408-414.1803>