



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**FESLEĞEN TOHUMLARINDAN PROTEİN İZOLATI VE
BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU, İZOLAT
VE BİYOAKTİF PEPTİTLERİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şerife Melike DALMIŞ

Danışman: Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU

TOKAT- 2024



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 2023/79)
tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum “Fesleğen Tohumlarından Protein İzolatı ve Biyoaktif Peptit Üretiminin Optimizasyonu, İzolat ve Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

10/12/2024

Şerife Melike DALMIŞ

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimde bana yol gösteren, tecrübeleri ve değerli bilgilerini paylaşan, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli ve saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, kendisiyle çalışmaktan mutlu olduğum değerli ve saygıdeğer Arş. Gör. İzzet TÜRKER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama maddi olarak destek olan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje No: 2023/79) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca maddi manevi yanımda olan, benim geleceğim için uğraşan, beni her konuda destekleyen ve bana yol gösteren çok değerli babam İsmail DALMIŞ'a, desteği ve varlığı beni motive eden huzur veren, beni bugünlere getiren canım annem Kadriye DALMIŞ'a, bu süreçte düştüğümde kaldıran sevgili ablam Yasemin DALMIŞ'a, yanımda olan varlığıyla beni mutlu eden maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili ve değerli kardeşim Alperen DALMIŞ'a, uzakta da olsa bana güç veren her zaman destekleyen canım abim Cafer DALMIŞ'a, en değerli hazinem aileme her zaman yanımda oldukları ve beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Şerife Melike DALMIŞ

10 Aralık 2024

ÖZET

FESLEĞEN TOHUMLARINDAN PROTEİN İZOLATI VE BİYOAKTİF PEPTİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU, İZOLAT VE BİYOAKTİF PEPTİTLERİN KARAKTERİZASYONU

Dalmış, Şerife Melike
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hilal İşleroğlu
Aralık 2024, x + 124 sayfa

Bu tez çalışmasında, fesleğen tohumundan proteinlerin ekstraksiyonu amacıyla enzimatik ön işlem uygulanarak klasik alkali ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işlemleri kullanılmıştır. Enzimatik ön işlem için pH (3.0-5.0), sıcaklık (35-50°C), enzim miktarı (0.5-5.0 FBGU/g tohum) ve işlem süresi (1-4 saat) bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış, Box-Behnken deneme planı kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlem için optimum koşullar, pH 3.01, sıcaklık 52.11°C, enzim miktarı 3.75 FBGU/g tohum ve süre 3.70 saat olarak belirlenmiş, bu koşullarda protein verimi %86.55, indirgen şeker miktarı ise 164.63 mg/g tohum olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, su ve yağ tutma kapasiteleri, köpük özellikleri (kapasite ve stabilite), emülsifikasyon özellikleri (aktivite, stabilite ve kapasite) ve çözünürlük özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca, fesleğen tohumu proteinlerinin yapısal ve termal özellikleri ile amino asit kompozisyonu da belirlenmiştir. En yüksek koagüle protein yüzdesi (%7.0), su tutma kapasitesi (5.2 g/g) ve köpük kapasitesi (%71) enzimatik ön işlem ve UDE işlemi ile elde edilen örneklerde gözlemlenmiştir. Protein çözünürlüğü pH 4.0'da en düşük seviyede (izoelektrik nokta) bulunurken, pH 12.0'da en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen fesleğen tohumu protein izolatından biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz işlemi ile biyoaktif peptit üretiminin optimizasyonu sağlanmış ve optimum işlem koşulları enzim:substrat oranı %12.26, alkalaz:flavourzyme oranı 0.63 U/U ve hidroliz süresi 157.33 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda hidroliz derecesi %73.73, DPPH serbest radikal inhibisyonu %41.23 olarak hesaplanmıştır. Üretilen biyoaktif peptitlerin IC₅₀ değerleri DPPH için 8.0 µg/mL, ABTS için 15.8 µg/mL, hidroksil serbest radikali için 9.15 µg/mL, şelatlama aktivitesi için 4.9 mg/mL olarak belirlenmiştir. Anti-hipertansif aktivite için IC₅₀ değeri 4.3 mg/mL, anti-diyabetik aktivite göstergesi olarak α -amilaz ve α -glukosidaz için inhibe etme IC₅₀ değerleri sırasıyla 3.9 mg/mL ve 4.8 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Biyoaktif peptitlerin gastrointestinal sistem (GİS) stabiliteyi değerlendirildiğinde, ağız safhasında antioksidan aktivitenin ~%68 oranında korunduğu, ancak mide safhasında bu oranın ~%34'e, bağırsak safhasında ise ~%15'e düştüğü tespit edilmiştir. Şelatlama aktivitesi, GİS sindirimi sonrası yaklaşık

%80 oranında azalma göstermiştir. Anti-hipertansif aktivite ağız safhasında %80 oranında korunurken, bağırsak safhasında bu aktivitenin %86'sının kaybedildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, anti-diyabetik aktivite bağırsak safhasında ~%84 oranında azalmıştır. Sonuç olarak, fesleğen tohumu protein izolatlarının yüksek besin değeri ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimatik ön işlem ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemlerinin protein verimini ve fonksiyonel özellikleri artırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, izolatlardan üretilen biyoaktif peptitlerin güçlü antioksidan, antimikrobiyal, anti-hipertansif ve anti-diyabetik aktiviteler sergilediği ve çeşitli sağlık yararları sunma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak, GİS sırasında bazı biyolojik aktivitelerde kayıplar olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular, fesleğen tohumu protein izolatları ve biyoaktif peptitlerin fonksiyonel gıda formülasyonlarında ve sağlık destekleyici ürünlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Fesleğen tohumu, Protein izolatu, Biyoaktif peptit, Ultrasonik destekli ekstraksiyon, Enzimatik hidroliz

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF PROTEIN ISOLATE AND BIOACTIVE PEPTIDE PRODUCTION FROM BASIL SEEDS, CHARACTERIZATION OF ISOLATE AND BIOACTIVE PEPTIDES

Dalmış, Şerife Melike

Master's Thesis, Food Engineering Division

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hilal İşleroğlu

December 2024, x + 124 pages

In this thesis, enzymatic pretreatment was applied to extract proteins from basil seeds using conventional alkaline extraction and ultrasonic-assisted extraction (UAE) methods. For enzymatic pretreatment, pH (3.0-5.0), temperature (35-50°C), enzyme concentration (0.5-5.0 FBGU/g seed), and time (1-4 hours) were identified as independent variables, and optimization was carried out using the Box-Behnken experimental design. The optimal conditions for enzymatic pretreatment were determined as pH 3.01, temperature 52.11°C, enzyme concentration 3.75 FBGU/g seed, and time 3.70 hours. Under these conditions, the protein yield was calculated as 86.55%, while the reducing sugar content was 164.63 mg/g seed. The coagulated protein percentage, water and oil holding capacities, foaming properties (capacity and stability), emulsifying properties (activity, stability, and capacity), and solubility characteristics of the protein isolates were comprehensively examined. Additionally, structural and thermal properties and amino acid composition of basil seed proteins were determined. The highest coagulated protein percentage (7.0%), water holding capacity (5.2 g/g), and foaming capacity (71%) were observed in the samples produced using enzymatic pretreatment and UAE. Protein solubility was the lowest at pH 4.0 (isoelectric point) and reached its highest level at pH 12.0.

Bioactive peptides were produced from the basil seed protein isolate obtained in this thesis study. The enzymatic hydrolysis process for bioactive peptide production was optimized, with the optimal process conditions determined as enzyme:substrate ratio 12.26%, alcalase:flavourzyme ratio 0.63 U/U, and hydrolysis time 157.33 minutes. Under these conditions, the degree of hydrolysis was calculated as 73.73%, and DPPH free radical inhibition as 41.23%. The IC₅₀ values of the produced bioactive peptides were determined as 8.0 µg/mL for DPPH, 15.8 µg/mL for ABTS, 9.15 µg/mL for hydroxyl free radical scavenging activity, and 4.9 mg/mL for chelating activity. For anti-hypertensive activity, the IC₅₀ value was determined as 4.3 mg/mL, while the IC₅₀ values for α-amylase and α-glucosidase inhibition, indicative of anti-diabetic activity, were 3.9 mg/mL and 4.8 mg/mL, respectively. Additionally, the antimicrobial activities of the bioactive peptides were determined, showing efficacy against Gram-positive bacteria. When the gastrointestinal system (GIS) stability of the bioactive peptides was evaluated, antioxidant activity was preserved at approximately 68% during the oral phase but decreased to ~34% in the gastric phase and ~15% in the intestinal phase. Chelating activity decreased by approximately 80% after GIS digestion. Anti-hypertensive activity was retained at 80% during the oral phase but showed an 86% reduction in the intestinal phase. Similarly, anti-diabetic activity decreased by ~84% in the intestinal phase. In conclusion, basil seed protein isolates were found to possess high nutritional value and functional properties. Enzymatic treatment and ultrasonic-assisted extraction methods significantly enhanced

the protein yield and functional characteristics. Moreover, the bioactive peptides derived from the isolates demonstrated strong antioxidant, antimicrobial, anti-hypertensive, and anti-diabetic activities, highlighting their potential to offer various health benefits. However, it has been observed that some biological activities are lost during GIS. These findings suggest that basil seed protein isolates and bioactive peptides could be utilized in functional food formulations and health-supportive products.

KEY WORDS: Basil seed, Protein isolate, Bioactive peptide, Ultrasonic assisted extraction, Enzymatic hydrolysis



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	3
2.1 Bitkisel Proteinler	3
2.2 Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyon Yöntemleri.....	10
2.2.1 Kimyasal yöntemler.....	11
2.2.2 Fiziksel yöntemler	12
2.2.3 Enzimatik ekstraksiyon	15
2.3 Biyoaktif Peptitler	19
2.3.1 Biyoaktif peptit üretimi	20
2.3.2 Enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptit üretimi	22
2.3.3 Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özellikleri.....	25
2.4 Fesleğen ve Fesleğen Tohumu	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1 Materyal.....	35
3.2 Ekstraksiyon İşlemi ve Protein İzolatlarının Üretimi	35
3.3 Protein İzolatlarının Karakterizasyonu	38
3.3.1 Koagüle protein yüzdesinin belirlenmesi	38
3.3.2 Su ve yağ tutma kapasitelerinin belirlenmesi	39
3.3.3 Köpük özelliklerinin belirlenmesi	39
3.3.4 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi	39

3.3.5	Çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi	41
3.3.6	Moleküler ağırlığın belirlenmesi	41
3.3.7	Yapısal özelliklerin belirlenmesi	42
3.3.8	Termal özelliklerin belirlenmesi.....	42
3.3.9	Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi	42
3.4	Fesleğin Tohumu Protein İzolatından Biyoaktif Peptit Üretimi	43
3.5	Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu	44
3.5.1	Hidroliz derecesinin belirlenmesi	44
3.5.2	Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	45
3.5.3	Şelatlama aktivitesinin belirlenmesi.....	46
3.5.4	Anti-hipertansif aktivitenin belirlenmesi.....	47
3.5.5	Anti-diyabetik aktivitenin belirlenmesi	48
3.5.6	Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	49
3.5.7	Gastrointestinal stabilitenin belirlenmesi	49
3.6	İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon	50
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	52
4.1	Fesleğin Tohumundan Protein Ekstraksiyonu	52
4.2	Fesleğin Tohumu Protein İzolatının Karakterizasyonu	57
4.2.1	Koagüle protein yüzdesi	57
4.2.2	Köpük özellikleri	58
4.2.3	Su ve yağ tutma kapasitesi	60
4.2.4	Emülsifikasyon Özellikleri	63
4.2.5	Çözünürlük Özellikleri	65
4.2.6	Moleküler ağırlık	66
4.2.7	Yapısal özellikler	67
4.2.8	Termal özellikler.....	71
4.2.9	Amino asit kompozisyonu	73
4.3	Fesleğin Tohumu Protein İzolatından Biyoaktif Peptit Üretimi	75
4.4	Fesleğin Tohumu Protein İzolatından Elde edilen Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu	79
4.4.1	Antioksidan aktivite.....	80
4.4.2	Şelatlama aktivitesi.....	82

4.4.3	Anti-hipertansif aktivite.....	83
4.4.4	Anti-diyabetik aktivite.....	85
4.4.5	Antimikrobiyal aktivite	86
4.4.6	Biyoaktif peptitlerin gastrointestinal sistem (GİS) stabiliteleri.....	89
5.	SONUÇ	94
6.	KAYNAKLAR.....	99
7.	ÖZGEÇMİŞ	124



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

IC_{50}	%50 inhibisyonu sağlayan konsantrasyon
k	Kodlanmış faktör sayısı
p	Önemlilik derecesi
R^2	Regresyon katsayısı
T_d	Denatürasyon sıcaklığı
α_i	Model katsayıları
β_0	Model katsayıları
ΔH_d	Denatürasyon entalpisi

Kısaltmalar

Açıklama

ABTS	2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit]
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ANOVA	Varyans analizi
C.V.	Varyasyon katsayısı
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
E+KE	Enzim+klasik ekstraksiyon ile elde edilen protein izolatu
E+UDE	Enzim +ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen protein izolatu
FRAP	Demir iyonu indirgeme gücü
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GİS	Gastrointestinal sistem
K	Kontrol protein izolatu
PRESS	Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı
SD	Serbestlik derecesi
UDE	Ultrasonik destekli ekstraksiyon
UFLC	Ultra hızlı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole dedektör

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Bradford metodunda kullanılan standart eğri	41
Şekil 4.1. Yanıt yüzey grafikleri ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki (45°C sıcaklık ve 3 saat için): (a)-(b) protein verimi, (c)-(d) indirgen şeker	56
Şekil 4.2. Fesleğen tohumu protein izolatlarının çözünürlükleri.....	66
Şekil 4.3. Fesleğen tohumu protein izolatları için SDS-PAGE jel görüntüsü	67
Şekil 4.4. Fesleğen tohumu protein izolatlarına ait FT-IR spektrumu.....	69
Şekil 4.5. Protein izolatlarına ait Amid I bantları (a) kontrol (b) E+KE ve (c) E+UDE	70
Şekil 4.6. DSC termogramları (a) kontrol, (b) E+KE, (c) E+UDE.....	72
Şekil 4.7. Yanıt yüzey grafikleri ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki (150 dakika hidroliz süresi): (a-b) Hidroliz derecesi, (c-d) DPPH inhibisyonu...	78
Şekil 4.8. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin antimikrobiyal aktiviteleri (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. Typhimurium</i> , (c) <i>B. cereus</i> , (d) <i>S. aureus</i> ve (e) <i>L. monocytogenes</i> .	88
Şekil 4.9. Biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitelerinin <i>in vitro</i> koşullarda GİS stabiliteleri.....	90
Şekil 4.10. Biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitelerinin <i>in vitro</i> koşullarda GİS stabiliteleri.....	91
Şekil 4.11. Biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerinin <i>in vitro</i> koşullarda GİS stabiliteleri.....	92
Şekil 4.12. Biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktivitelerinin <i>in vitro</i> koşullarda GİS stabiliteleri.....	93

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı önemli bitkisel ve hayvansal ürünlerin protein ve amino asit içerikleri	7
Çizelge 2.2. Hayvansal ve bitkisel proteinlerin karşılaştırılması.....	9
Çizelge 2.3. Bitkisel kaynaklardan ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile protein ekstraksiyonu	14
Çizelge 2.4. Bitkisel kaynaklardan enzimatik ön işlem ve klasik alkali ekstraksiyon-ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemleri ile protein ekstraksiyonu	18
Çizelge 2.5. Farklı fesleğen tohumlarının amino asit bileşimi (mg/100 mg)	33
Çizelge 3.1. Enzimatik ön işlem için oluşturulan deneme planı.....	36
Çizelge 3.2. Fesleğen tohumu protein izolatına uygulanan enzimatik hidroliz deneme planı.....	44
Çizelge 3.3. Hidroksil süpürme aktivitesi için hazırlanan çözeltiler	46
Çizelge 4.1. Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon işlemi ile protein ekstraksiyonu	53
Çizelge 4.2. Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel veriler	55
Çizelge 4.3. Fesleğen tohumu protein izolatlarının koagüle protein yüzdeleri ve köpük özellikleri	60
Çizelge 4.4. Fesleğen tohumu protein izolatlarının su ve yağ tutma kapasiteleri	63
Çizelge 4.5. Fesleğen tohumu protein izolatlarının emülsifikasyon özellikleri	65
Çizelge 4.6. Protein ikincil yapı fraksiyonlarının yüzde (%) oranları	71
Çizelge 4.7. Fesleğen tohumu protein izolatına ait amino asit kompozisyonu.....	74
Çizelge 4.8. Fesleğen tohumu protein izolatına uygulanan enzimatik hidroliz işlemi ...	76
Çizelge 4.9. Enzimatik hidroliz işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel veriler	77
Çizelge 4.10. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin antioksidan aktiviteleri	81
Çizelge 4.11. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin şelatlama aktiviteleri	83
Çizelge 4.12. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin anti-hipertansif aktiviteleri	85
Çizelge 4.13. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin anti-diyabetik aktiviteleri	86

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun 2050 yılına kadar dokuz milyarı aşacağı tahmin edilmektedir (Sim ve ark., 2021). Bu artış, beslenme ve gıdaya olan talebi artırmakta ve yeni kaynakların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Günümüzde bitkisel kaynaklar, sağlık yararları, besleyici özellikleri ve sürdürülebilirlikleriyle bu talebi karşılamada önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle protein ihtiyacının karşılanması için bitkisel proteinler hayvansal proteinlere alternatif bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Bitkisel proteinlerin düşük maliyetli olması, yaygın olarak bulunabilirliği ve besin değerleri bu kaynaklara olan ilgiyi artırmaktadır (Langyan ve ark., 2022).

Proteinler, tüm yaşamın temel yapı taşlarından biri olup birincil metabolitler arasında önemli bir yere sahiptir. Proteinler, amino asit zincirlerinden oluşan ve farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahip makromoleküllerdir (Arif ve Pauls, 2018). İnsan beslenmesinde protein gereksinimi genellikle hayvansal proteinlerle karşılanmakla birlikte, bu kaynaklara bağlı sağlık riskleri ve sürdürülebilirlik sorunları alternatif bitkisel proteinlerin geliştirilmesini teşvik etmektedir. Son yıllarda, proteinlerin bitkisel kaynaklardan ekstraksiyonu ve izole edilmesi üzerine yapılan çalışmalar artmıştır.

Fesleğen tohumu, *Lamiaceae* familyasına ait bir bitki olup, fonksiyonel ve besin değeri açısından zengin bir kaynaktır. Fesleğen tohumu, protein, diyet lifi ve biyoaktif bileşikler açısından yüksek içeriğe sahiptir. Literatürde fesleğen tohumu proteinlerinin ekstraksiyonu, izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, fesleğen tohumundan elde edilen protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri ve potansiyel kullanım alanları büyük bir ilgi konusu olmaya devam etmektedir. Fesleğen tohumu proteinlerinin değerlendirilmesi, bitkisel proteinlerin alternatif bir kaynak olarak kullanılmasına yönelik önemli bir fırsat sunmaktadır. Bitkisel proteinlerin ekstraksiyonu, protein verimi ve fonksiyonelliği üzerinde doğrudan etkili olan kritik bir adımdır. Klasik alkali ekstraksiyon yöntemi, protein ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmakla birlikte uzun işlem süreleri ve yüksek çözgen ihtiyacı gibi dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajları gidermek amacıyla, son yıllarda ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemi ön plana çıkmıştır. UDE daha yüksek ekstraksiyon verimine daha kısa sürede ulaşılmasını sağlarken, düşük sıcaklıklarda çalışması

sayesinde proteinlerin denatürasyonunu azaltarak fonksiyonel özelliklerini koruyabilmektedir (Vilkhu ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2021a).

Ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen biyoaktif peptitler, insan sağlığı üzerinde önemli biyolojik etkiler göstermektedir. Biyoaktif peptitler genellikle düşük moleküler ağırlığa sahip kısa amino asit zincirleri olup, antioksidan, anti-hipertansif, şelatlama ve anti-diyabetik aktiviteler gibi sağlık açısından faydalı özellikler sergilerler (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Bu özellikler, biyoaktif peptitleri gıda endüstrisinde işlevsel ürünlerin geliştirilmesi için ideal bileşenler haline getirmektedir. Ancak, bu peptitlerin biyolojik aktivitelerini koruyabilmesi, sindirim sistemi koşullarına dayanıklı olmalarına bağlıdır. Gastrointestinal sistem (GİS) stabiliteyi biyoaktif peptitlerin biyoyararlanımı ve etkili kullanımında kritik bir öneme sahiptir. Sindirim süreci sırasında peptitlerin aktivitelerinde kayıplar meydana gelebilmekte ve bu durum, tasarlanan fonksiyonel gıdaların etkinliğini sınırlandırmaktadır (Zhu ve ark., 2021). Bu nedenle, biyoaktif peptitlerin GİS koşullarına dayanıklılıklarının değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, fesleğen tohumunda bulunan proteinlerin enzimatik ön işlem uygulanarak klasik alkali ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında, en yüksek protein verimini sağlayan optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiş, elde edilen protein izolatlarının fonksiyonel, yapısal ve termal özellikleri ile amino asit profilleri incelenmiştir. Ayrıca, enzimatik hidroliz işlemi ile fesleğen tohumu protein izolatlarından biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirilmiş, bu peptitlerin antioksidan, şelatlama, anti-hipertansif ve anti-diyabetik aktiviteleri detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca, elde edilen biyoaktif peptit fraksiyonları için antimikrobiyal aktivite ve *in vitro* gastrointestinal sistem çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Bitkisel Proteinler

Proteinin yetersiz alınması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sağlık açısından ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Aynı zamanda, modern beslenme alışkanlıkları ve diyet yapan bireylerde protein eksikliğine bağlı dengesiz beslenme, gelişmiş ülkelerde de yaygın bir durumdur. Günümüzde, dünya nüfusunun artışı, hayvansal protein üretiminin çevresel etkilerinin olumsuzluğu, vejetaryen ve vegan beslenme eğilimlerin artması, yenilenebilir ve sürdürülebilir protein kaynaklarına olan talebi giderek artırmaktadır (Pojić ve ark., 2018). Yeni protein kaynaklarına olan artan talep doğrultusunda bitkisel proteinlerin gıda sektöründe kullanım oranları artış göstermektedir. Proteinlerin gıda endüstrisindeki fonksiyonel özellikleri arasında tat verme, doku iyileştirme, jel oluşturma, çözünürlük, viskozite, bağlayıcılık, köpürme, su tutma ve yağ bağlama gibi nitelikler yer almaktadır. Ayrıca, bitkisel gıdalar ile bunların yan ürünleri ve atıklardan geri kazanılan proteinler, beslenme takviyeleri ve gıda bileşenleri olarak kullanılmakta; emülsifiye etme, jel oluşturma, köpürme ve su bağlama özellikleri nedeniyle fonksiyonel gıda bileşenleri olarak teknoloji alanında değerlendirilmektedir (Gupta ve Nayak, 2015).

Proteinler, biyokimyasal açıdan oldukça kompleks yapılar olup karbon, hidrojen, oksijen, azot ve kükürt atomlarını içeren amino asitlerin çeşitli dizilim ve sayılarda peptit bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan büyük organik bileşiklerdir. Amino asitlerin birbirlerine bağlanması sırasında oluşan peptit bağları, bir amino asidin karboksil grubu ile diğerinin amino grubu arasında kurulan kovalent bağlardır. Ancak protein yapısının oluşumunda yalnızca peptit bağları değil, disülfid ve hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlar da proteinlerin üç boyutlu yapısının stabilitesinde rol oynamaktadır (Han ve ark., 2018). Proteinlerin bu karmaşık yapısı, onları hem gıda hem de ilaç sanayisinde çok çeşitli alanlarda kullanışlı hale getirmektedir. Bunun yanı sıra, proteinler gıdalarda temel bir besin maddesi olarak karbonhidratlar ve lipidler ile önemli bir makro besin grubunu oluşturmaktadır. Proteinlerin sindirimi sonucu 4 kcal/g enerji açığa çıkmaktadır ki bu da proteinlerin diyetle alınmasının önemini vurgular (Nadathur ve ark., 2017).

Proteinler hem hayvansal kaynaklı (et, balık, süt ürünleri, yumurta) hem de bitkisel kaynaklı (tahıl, baklagil vb.) besinlerden sağlanabilmektedir. Hayvansal kaynaklı proteinlerin biyoyararlanımı oldukça yüksektir ve bu proteinlerin içerdikleri vitaminler ve mineraller de sağlık açısından büyük fayda sağlar. Ancak, et ve süt ürünleri gibi hayvansal kaynaklı gıdaların aşırı tüketimi, yüksek kolesterol ve doymuş yağ asitleri nedeniyle kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Muguerza ve ark., 2004). Bunun yanı sıra, hayvansal gıdalar aracılığıyla bulaşabilen hastalıklar (deli dana hastalığı gibi) ve küresel ölçekte artan hayvan kaynaklı protein kıtlığı, bu gıdaların tüketiminin giderek azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, dini hassasiyetler (helal, kosher vb.), vejetaryen ve vegan gibi beslenme trendleri de hayvansal protein kaynaklarının tüketiminde belirgin bir azalmaya yol açmıştır (Muguerza ve ark., 2004). Günümüzde sağlıklı ve dengeli beslenme bilincinin artmasıyla birlikte bitkisel protein kaynaklarına yönelim hızla artmaktadır. Araştırmalar, meyve ve sebzelerin, su ürünlerinin, tahılların ve çoklu doymamış yağların dengeli bir şekilde tüketildiği Akdeniz diyeti gibi beslenme şekillerinin, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite gibi birçok kronik hastalığa karşı koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Di Daniele ve ark., 2017). Bu tür beslenme modelleri, özellikle hayvansal gıdaların tüketimini azaltarak bitkisel gıdalara yönelen bireyler için oldukça faydalı olarak değerlendirilmektedir. Bitkisel gıdalar, sadece vitamin, mineral ve lif sağlamalarıyla değil, aynı zamanda biyolojik olarak aktif peptitler ve proteinler içermeleriyle de ön plana çıkmaktadır (Aiking, 2011).

İnsan beslenmesi açısından, proteinlerin miktarı ve kalitesi, vücudun metabolik işlevlerini yerine getirmek için eşit derecede önemlidir. Protein kalitesi farklı protein kaynakları arasında, yapısında bulunan amino asitlerin oranlarındaki farklılıktan dolayı değişlik gösterir. Bir gıdadaki protein kalitesi, özellikle esansiyel amino asitler (EAA) ve bunların sindirim ve emilim sonrasındaki biyoyararlılığına bağlıdır. Proteinlerin biyoyararlılığı, yaşam döngüsü boyunca normal vücut kompozisyonunu ve işlevini sürdürmek için önemli bir konudur. Hücresel protein sentezinde, protein kalitesi, protein miktarına göre daha fazla önem taşır. İnsan beslenmesinde protein kalitesi, amino asit skoru (AAS) olarak da ifade edilmektedir. AAS, EAA'ların içeriği ve bunların vücudun gereksinimlerini karşılama kapasitesidir. AAS, 'EAA içeriğinin gereksinim miktarına oranı' olarak tanımlanır. 1990'larda, Dünya Sağlık rgt (WHO) ile Gıda ve Tarım

Örgütü (FAO) protein sindirilebilirliği-düzeltilmiş amino asit skoru (PDCAAS) adlı yeni bir yöntemi tanıtmıştır (FAO/WHO, 1991). PDCAAS proteinin genel sindirilebilirliğine bağlıdır ve bireysel amino asitler için değişiklik gösterebilir. Bu nedenle, FAO tarafından bireysel EAA'ların sindirilebilirliğine dayanan yeni bir yöntem olan sindirilebilir elzem amino asit skoru (DIAAS) tanıtılmıştır (FAO/WHO, 2013). Yapılan bir çalışma, PDCAAS değerlerinin protein kalitesini, özellikle düşük kaliteli protein kaynaklarında, ince bağırsaktaki amino asit sindirilebilirliğinin DIAAS'a kıyasla yanlış bir şekilde değerlendirdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, klinik olarak hassas bireylerde, daha iyi protein gereksinimlerini karşılamak için DIAAS değerlerinin kullanılması önerilmektedir (Mathai ve ark., 2017). Berrazaga ve ark. (2019), protein sindirilebilirliği, biyolojik değer, PDCAAS ve DIAAS temelinde farklı hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen proteinlerin kalitesini değerlendirmişlerdir. Hayvansal kaynaklı tüm proteinlerin, bitkisel proteinlerden daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Neredeyse tüm hayvansal kaynakların PDCAAS değeri 1'e yakınken, bitkisel kaynaklardan yalnızca soya ve kanolanın hayvansal gıdalarla karşılaştırılabilir değerlere sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 2.1) (Berrazaga ve ark., 2019).

Protein kaynakları EAA sağlama temeline dayanarak uygun miktarda tüm EAA'ları sağlayan 'yüksek kaliteli veya tam proteinler' ile bir veya daha fazla EAA'nın eksik olduğu 'düşük kaliteli veya eksik proteinler' olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Genel olarak, hayvansal proteinler, amino asit profillerinin insan vücudu gereksinimlerine daha yakın olması ve iyi sindirilebilirlikleri nedeniyle yüksek kaliteli proteinlerdir. Buna karşın, bitkisel kaynaklar genellikle lisin, metiyonin, treonin ve triptofan gibi bir veya daha fazla amino asit bakımından eksik olduğundan düşük kaliteli proteinler olarak kabul edilmektedir. Buğday, pirinç, mısır, kuruyemişler ve diğer tahıllar ile tohumlar lisin bakımından eksikken, bazen treonin ve triptofan bakımından da eksik olabilmektedir. Baklagiller, bezelye, mercimek ve sebzelerde sınırlayıcı amino asit metiyonindir. Ancak, soya fasulyesi, kinoa ve çiya tohumları istisnai olarak bu amino asitleri içermektedir (Gropper ve ark., 2018). Düşük kaliteli proteinlerle sınırlı olan doğru planlanmamış bir diyet EAA eksikliğine yol açabilir. Bu durum hücresel proteinlerin üretilmesinde yetersizlikle sonuçlanabilir ve vücutta metabolik bozulmalara neden olabilir. Vücudun EAA gereksinimlerini karşılamak sağlık ve kaliteli yaşam açısından oldukça önemlidir. İnsan vücudu açısından elzem olan bu ihtiyacın karşılanması, protein alımının artırılması,

diyetin sınırlayıcı amino asitler ile takviye edilmesi ve farklı bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinlerin karıştırılması ile sağlanabilir. Örnek olarak baklagiller, yüksek lizin içeriğine sahipken sülfür içeren metiyonin amino asidi bakımından eksiktir. Baklagiller, lizin açısından sınırlı olan ancak metiyonin ve sisteini yeterli miktarda bulunduran tahıllarla birleştirilerek diyet tamamlanabilir (Çizelge 2.1) Ayrıca, tahılların süt ve diğer süt ürünleri ile birleştirildiği veya baklagillerin et ürünleri ile takviye edildiği özel reçeteler hazırlanabilir (Berrazaga ve ark., 2019).



Çizelge 2.1. Bazı önemli bitkisel ve hayvansal ürünlerin protein ve amino asit içerikleri (Balandrán-Quintana ve ark., 2019)

Ürün	Bebek İhtiyacı	Yetişkin İhtiyacı	Mısır (beyaz, çiğ)	Buğday (sert, kışlık)	Pirinç (beyaz, çiğ)	Arpa (çiğ)	Sorgum (çiğ)	Kinoa (çiğ)	Soya (protein izolatu)	Bezelye (pişmiş)	Barbunya (pişmiş)	Kanola	Yer fıstığı	Dana Eti	Henn's Egg	Balık	İnek Sütü	Tavuk
Protein (g/100 g)																		
Amino asit	g/gün		9	13	7	10	10	14	93	8	9	12	24	19	12.5	18	3.3	21
Amino asitler (mg/g protein)																		
Triptofan	18	6	7	13	12	17	51	12	14	11	12	13	9.7	2	16	2	14	3
Treonin	47	24	38	29	36	34	30	30	36	36	37	44	34	8	49	8	45	9
İzolösin	57	23	36	36	43	37	38	36	47	41	47	23	35	8	63	9	60	11
Lösin	101	52	123	68	83	68	13	60	80	72	85	71	65	15	88	15	98	16
Lizin	69	47	28	27	36	37	20	54	61	73	70	56	36	16	70	17	79	18
SAA	38	23	39	42	44	41	31	36	24	26	22	45	25	7	56	7	34	9
AAA	87	41	90	78	87	85	79	61	88	75	82	70	88	14	98	13	96	16
Valin	56	56	51	44	61	49	47	42	48	47	57	55	42	9	72	10	67	11
Histidin	23	17	31	23	24	23	22	29	26	24	27	31	25	6	24	5	28	7
AAS	-	-	0.50	0.52	0.71	0.73	0.40	1.00	0.90	1.00	0.90	-	0.70	1.00	-	1.00	-	1.00
PDCAAS	-	-	0.60	0.42	0.63	0.61	0.16	0.70	0.91	0.60	0.70	0.93	0.50	1.00	-	1.00	-	1.00
DIAAS	-	-	0.50	0.43	0.64	0.51	0.29	-	0.60	0.60	0.60	-	0.40	1.00	-	1.00	-	1.00

SAA: Sülfür içeren aminoasitler (metiyonin+sistein), AAA: Aromatik amino asitler (fenilalanin+tirozin), AAS: Amino asit skoru, PDCAAS: Protein sindirilebilirliği-düzeltilmiş amino asit skoru, DIAAS: Sindirilebilir elzem amino asit skoru

Düşük kaliteli proteinlerin sürekli tüketimi EAA eksikliğine yol açabilir. Bu durum hücresel protein sentezinin azalmasına veya durmasına ve dokuya özgü amino asitlerin parçalanmasının artmasına neden olabilmektedir. EAA eksikliği sendromu ve belirtileri arasında kusma, iştahsızlık, duygusal bozukluklar, uykusuzluk, anemi, iskelet kası erimesi, fiziksel yorgunluk ve güçsüzlük, kilo kaybı, metabolik bozukluklar, kardiyovasküler anormallikler, hipertansiyon, oksidatif stres, hızlı yaşlanma, bağışıklık sisteminin bozulması, enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık ve periferik ödem bulunur (Hou ve Wu, 2018). Eksiklik devam ettiği sürece diş ve kemik çürümesi, saç dökülmesi, cilt döküntüsü, gelişim güçlüğü, dislipidemi ve hiperglisemi gibi durumlar artabilir ve bu durumlar ileri vakalarda hayati tehlikelere yol açabilir (Iqbal, 2022).

Proteinlerin üretiminde verim, maliyet ve sürdürülebilirlik açısından oldukça önemli bir husustur. Verimlilik açısından kilogram vücut ağırlığı başına en yüksek miktarda protein, büyüyen etçi civcivler tarafından üretilirken, onu tavuklar ve süt inekleri takip etmekte, en düşük verim ise sığır etinde elde edilmektedir. Ancak, çevresel maliyet ve kaynak verimliliği, gübre, pestisit ve su kullanımı ve sera gazı emisyonları açısından bitkisel proteinleri üretmek için gereken miktar, eşit miktarda sığır eti, tavuk ve yumurta üretmekten çok daha düşüktür. Örnek olarak, sığır etinden 1 kg protein elde edebilmek için gereken arazi, su, yakıt, gübre ve pestisit miktarları, 1 kg barbuta proteini elde edebilmek için gerekenden sırasıyla 18, 10, 9, 12 ve 10 kat daha fazladır. Ayrıca, bir sığır 1 kg protein üretmek için tavuk ve yumurtaya kıyasla 5-6 kat daha fazla gübre üretmektedir (Sabaté ve ark. 2015). Bu nedenlerden dolayı, son zamanlarda bazı şirketler ve araştırma kuruluşları yalnızca hayvansal protein, yağ ve diğer bileşenlerin üretimi üzerinde çalışmakla kalmayıp, aynı zamanda ‘vegan süt’ ve ‘yapay et’ üretmek için *in vitro* hücre kültürü yöntemleri de geliştirmektedir (Balandrán-Quintana ve ark. 2019). Tüm faktörler göz önüne alındığında, bitkisel gıdalar, hayvansal gıdalara göre daha sürdürülebilir olup, dünyada gıda kaynaklı sorunları bertaraf etmek için daha az doğal kaynakla ve çevreye daha az olumsuz etkilerle en iyi çözümü sunmaktadır (Sabaté ve Soret, 2014). Hayvansal ve bitkisel proteinlerin genel karşılaştırılması Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Hayvansal ve bitkisel proteinlerin karşılaştırılması

Hayvansal Proteinler	Bitkisel Proteinler
>%97 sindirilebilirlik	%70-90 sindirilebilirlik
%90 biyoyararlılık	%60-70 biyoyararlılık
Kas gelişimi ve doku oluşumuna destek	Kas gelişimine daha az fayda
B12 ve D vitaminlerince zengin	Magnezyum ve A vitaminince zengin
Tüm esansiyel amino asitler	Lisin, triptofan ve sülfür içeren amino asitler genel olarak eksik
Sindirim sonucunda yüksek miktarda biyoaktif peptit oluşumu	Hayvansal kaynaklara göre daha düşük miktarda biyoaktif peptit oluşumu
Doymuş yağ asitlerince yüksek	Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin
Yüksek kolesterol	Kolesterol bulunmaz
Trans yağlar	Çok düşük miktarda trans yağ
Lif bulunmaz	Çözünür ve çözünmez lif ile prebiyotikler açısından oldukça zengin
Sınırlı sayıda biyoaktif bileşen (taurin, kolin, laktoferrin)	Polifenoller, izoprenoidler, klorofiller, organik asitler ve flavonoidler gibi birçok biyoaktif bileşen
İşlenmiş et ürünlerinde karsinogen bulunma olasılığı	İşlenmiş bitkisel proteinlerde besin içeriğinde azalma olasılığı
Yüksek üretim maliyeti	Düşük üretim maliyeti
Uzun vadede tüketim sonucunda kalp krizi, kanser, diyabet, yüksek kolesterol ve aşırı kilo olasılığı	Kronik rahatsızlıkların risk faktörlerini azaltma

2.2 Bitkisel Proteinlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkisel proteinler bulundukları bitki matriksi içinden birçok farklı yolla ekstrakte edilmektedir. Bitkisel proteinlerin ekstraksiyonunda en önemli hususlar, yüksek protein verimi sağlanırken ekstrakte edilen proteinlerin besin değerinin ve fonksiyonel özelliklerinin korunmasıdır (Kumar ve ark., 2021b). Bitkisel proteinlerin ekstraksiyon yöntemlerinden ilki kimyasal ekstraksiyondur.

Kimyasal yöntemler, su, alkali, organik çözücü ve asit gibi kullanılan çeşitli ekstraksiyon çözücülerini temelinde sınıflandırılmaktadır. Kimyasal yöntemler, protein geri kazanımını artırmak amacıyla diğer yöntemlerle de birleştirilmektedir (Embaby ve ark., 2018; Bose ve ark., 2019; Deleu ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2019a; Kumar ve ark., 2021c). Maksimum geri kazanım ve minimum kayıp esas alınarak protein ekstraksiyonu için farklı kimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Bitkisel ürünlerden protein ekstraksiyonu genellikle üç aşamada gerçekleştirilir. İlk olarak, bitkisel kaynağın yağı giderilmekte, ardından protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmekte ve son olarak protein çöktürülmektedir (Kumar ve ark., 2021b). Yağın alınması aşamasında, protein ekstraksiyonunu engelleyen bileşenleri uzaklaştırmak için petrol eteri, n-hekzan ve n-pentan gibi çözücüler kullanılmaktadır. İkinci aşamada, sıcak veya soğuk sulu ekstraksiyonda tuzlar (NaCl gibi), iyonik deterjanlar (SDS gibi) ve iyonik olmayan deterjanlar (NP-40 ve Triton X100 gibi) kullanılarak proteinler ekstrakte edilmektedir. Organik çözücü bazlı ekstraksiyonda alkol (etanol, metanol gibi), tamponlar/güçlü denatüranlar (üre veya Tris-HCl, fenol gibi) kullanılmaktadır. Son olarak, izole edilen protein amonyum sülfat, etanol, metanol, aseton, sitrik asit, triklorasetik asit, hidroklorik asit ve izoelektrik nokta çöktürmesi gibi kimyasal veya çözücüler kullanılarak çöktürülmektedir. Kimyasal ekstraksiyon organik çözücü bazlı ve alkali bazlı ekstraksiyon olmak üzere iki grupta incelenebilmektedir. Bu yöntemlerden klasik alkali ekstraksiyon bitkisel proteinlerin ekstraksiyonunda en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Qiaoyun ve ark., 2017). Bitkisel proteinlerin ekstraksiyonu için enzimatik yöntemler de kullanılmaktadır (Görgüç ve ark., 2020; Thakur ve ark., 2024). Protein ekstraksiyonunda ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), vurgulu elektrik alanı destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve yüksek basınç destekli ekstraksiyon gibi fiziksel teknikler ayrıca kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2021b; Chandran ve ark., 2023).

2.2.1 Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemlerden en sık ve yaygın olarak kullanılan klasik alkali ekstraksiyon işlemidir. NaOH ve KOH gibi alkaliler, bazik pH'nın korunması ve yüksek bir ekstraksiyon verimi elde edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazik pH, protein içindeki disülfid bağlarının kırılmasına yol açarak protein geri kazanımını ve verimini artırmaktadır (del Mar Contreras ve ark., 2019). Çözgen pH'sının artmasıyla asidik ve nötr amino asitlerin iyonizasyonu gerçekleşerek proteinlerin çözünürlüğü artmaktadır. Bu nedenle, alkali bir ortamda protein ekstraksiyonu daha yüksek protein verimi sağlar. Bitkisel kaynaklardan klasik alkali protein ekstraksiyonu, ekstrakte edilen bitkisel proteinin biyoyararlanımını ve sindirilebilirliğini artırmakla birlikte, denatürasyon, lisinoalanin oluşumu, çapraz bağlanma, protein hidrolizi ve amino asit kaybı gibi etkenlerle protein kalitesini de düşürebilmektedir (del Mar Contreras ve ark., 2019; Deleu ve ark., 2019). Buna karşın, kolay uygulanabilmesi ve düşük maliyet gibi nedenlerle endüstride bitkisel kaynaklardan protein ekstraksiyonunda en sık kullanılan yöntem klasik alkali ekstraksiyon işlemidir (Thakur ve ark., 2024).

Literatürde klasik alkali ekstraksiyon işlemi ile ilgili birçok farklı çalışma mevcuttur. pH seviyelerinin 10.0 ve üzerine çıkarılmasıyla izole edilen protein veriminin arttığı birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Örneğin, pH 8.5'ten 12.5'e yükseltildiğinde ekstraksiyon veriminin bezelyede %35.1'den %58.1'e ve börülcede %36.4'ten %53.5'e yükseldiği bildirilmiştir (Mwasaru ve ark., 1999). Benzer şekilde başka bir çalışmada, alkali ekstraksiyon pH'sının 8.5'ten 9.5'e yükseltilmesiyle bezelye proteini veriminin %49'dan %58'e yükseldiği belirlenmiştir (Gao ve ark., 2020). Bununla birlikte, protein ekstraksiyonu sırasında, yüksek alkali koşullar protein denatürasyonuna neden olabilmektedir. Bu nedenle, artan protein verimleri ile denatürasyon derecesi arasında bir denge sağlanmalıdır. Öte yandan, artan sıcaklık ve uzun ekstraksiyon süreleri proteinlerin daha kolay ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. Ancak, sıcaklığın yükselmesi proteinlerin çökmesi ve termal denatürasyonuna da yol açabilir. Bu yüzden, protein ekstraksiyonu için oda sıcaklığı veya daha yüksek sıcaklıklar önerilmektedir (Chandran ve ark., 2023).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde klasik alkali ekstraksiyon için en dikkat çeken ekstraksiyon koşullarının katı:çözgen oranı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH olduğu

görülmektedir. Wani ve ark. (2008) karpuz çekirdeği için gerçekleştirilen 15 dakikalık klasik alkali ekstraksiyon işleminde 0.12 g/L konsantrasyonda NaOH, 1:70 katı:çözgen oranı, 40°C sıcaklık kullanmışlar ve ~%81 verimde protein ekstraksiyonu sağlamışlardır. Zhang ve ark. (2009) pamuk tohumundan pH 12.5, 1:2 katı:çözgen oranında 60°C’de 40 dakikalık klasik alkali ekstraksiyon gerçekleştirdikleri çalışmada %70 verim elde etmişlerdir. Embaby ve ark. (2018) *Acacia tortilis* tohumundan protein ekstraksiyonunu pH 11.0, 1:20 katı:çözgen oranı, 25°C sıcaklık ve 120 dakika ekstraksiyon süresi koşullarında gerçekleştirmişler ve %92 saflıkta protein elde etmişlerdir. Du ve ark. (2018) maş fasulyesinden pH 9.0’da 1:20 katı:çözgen oranı ve 40°C’de klasik alkali ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmişler ve %77 protein ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir. Isleroglu ve Olgun (2024) 34.5 g/L katı:çözgen oranı, pH 11.47 ve 4 saat ekstraksiyon süresi koşullarında, çemen otu tohumlarından %94 protein verimine ulaşmayı başarmışlardır. Klasik yöntemler maliyet açısından tercih edilse de uzun süre gerektiren ve çevre dostu olmayan tekniklerdir. Klasik alkali ekstraksiyonla yüksek verimlere ulaşılabildiği bilinmektedir; ancak bu yöntem, protein sindirilebilirliğini azaltmakta ve lizin ile sistein amino asitlerinin parçalanmasına yol açarak ekstrakte edilen proteinin kalitesini olumsuz etkilemektedir (Kumar ve ark., 2021b).

2.2.2 Fiziksel yöntemler

Protein ekstraksiyonunda proteinlerin bitki dokusundan ekstrakte edilebilmesi amacıyla fiziksel yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Protein ekstraksiyonunda yeni teknolojilerin kullanımı, ekstraksiyon verimini artırmanın yanı sıra proteinin teknolojik ve besleyici özelliklerini iyileştirir. Bu teknolojilerin, düşük maliyetli, güvenli ve çevre dostu bir seçenek olarak bitkisel protein üretiminde önemli bir yere sahip olabileceği düşünülmektedir (Tiwari, 2015). Ancak, yeni teknolojilerin endüstriyel ölçekte kullanımının hala sınırlı olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2016). Bitkisel kaynaklardan elde edilen proteinlerin fonksiyonel özellikleri, uygulanan ekstraksiyon yöntemiyle yakından ilgilidir ve bu nedenle, proteinlerin fonksiyonelliğini koruyacak yöntemler tercih edilmelidir (Pojić ve ark., 2018).

Fenolik bileşikler ve uçucu yağların ekstraksiyonunda kullanılan çevre dostu yeşil ekstraksiyon teknikleri, protein ekstraksiyonuna da uyarlanmakta ve günümüzde daha

fazla uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden en önemlisi, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan UDE tekniğidir (Vilkhu ve ark., 2010). UDE işlemi, 20 kHz ile 100 MHz aralığında ses dalgaları üretir ve çözeltide kavitasyon yaratır. Bu süreçte oluşan gaz kabarcıkları, bitki hücre duvarlarını mekanik olarak tahrip ederek ekstraksiyon verimini ve ekstrakte edilen bileşen miktarını artırır (Dzah ve ark., 2020). Ses dalgaları, kütle transferini hızlandırarak bitkisel hücre duvarına yapışık veya hücre içinde bulunan bileşenlerin geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve etkili bir şekilde ekstrakte edilmesini sağlar (Pojić ve ark., 2018).

UDE'nin protein ekstraksiyonunda kullanımı, ekstraksiyon süresini kısaltma, enerji tüketimini azaltma, çözügen kullanımını düşürme, çözeltinin homojenliğini artırma ve daha yüksek proses kontrolü sağlama amacı taşır (Chemat ve ark., 2017). UDE'nin ekstraksiyon verimini artırma etkisi, çözgüde ultrason dalgalarının yarattığı mikro kabarcıkların patlayarak proteinlerin çözgüye geçişini kolaylaştırmasıyla açıklanabilir (Bernardi ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda, UDE süreci, ultrasonik güç, katı:çözgen oranı ve ekstraksiyon süresi gibi parametrelerin verim üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (Pojić ve ark., 2018). Bu nedenle, farklı bitkisel kaynaklar için optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi gereklidir.

Örneğin, UDE kullanılarak bezelyeden protein ekstrakte edilen bir çalışmada, pH 9.6, 13.5 dakika ekstraksiyon süresi, 1:11.5 (g/mL) katı:çözgen oranı ve %33.7 ultrasonik genlikte %82.6 protein ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır (Wang ve ark., 2020a). Yağı alınmış pirinç kepeğinde klasik alkali ekstraksiyonda %20-30 olan protein verimi, UDE ile %64.5 seviyesine çıkarılmıştır (Ly ve ark., 2018). Karpuz çekirdeği proteinleri üzerinde yapılan bir çalışmada, pH 9.0, 1:50 katı-çözgen oranı, 90 W güç ve 25 kHz frekans kullanılarak %87 protein ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. UDE ile klasik yöntemden %20 daha az çözügen kullanılmıştır (Gadalkar ve Rathod, 2020).

UDE ile yapılan ekstraksiyonlarda, protein veriminin yanı sıra proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde de iyileşmeler gözlenmiştir. Örneğin, sümbül fasulyede klasik alkali ekstraksiyonda %41 verim elde edilirken UDE ile %70 protein verimi elde edilmiş, UDE ile elde edilen protein izolatlarının köpük kapasitesi, yağ tutma kapasitesi ve antioksidan aktivite değerlerinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2021). Benzer şekilde, soya proteinlerinde ultrasonikasyon sonrası çözünürlük ve emülsifiye etme özelliklerinin

arttığı bildirilmiştir (Jambrak ve ark., 2009; Hu ve ark., 2015). Ayrıca, UDE'nin proteinlerin köpük oluşturma kapasitesi ve su tutma kapasitesini artırdığı da belirtilmiştir (Morales ve ark., 2015; Hu ve ark., 2013). Literatürdeki araştırmalar, UDE'nin hem ekstraksiyon verimini artırdığını hem de proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirdiğini göstermektedir. Farklı bitkisel protein ekstraksiyonunda UDE'nin kullanımı ile ilgili yapılan bazı çalışmalar Çizelge 2.3'te listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Bitkisel kaynaklardan ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile protein ekstraksiyonu

Bitkisel Materyal	Ekstraksiyon koşulları	Verim	Kaynak
Pirinç posası unu	20 kHz, 448 W, 40 dakika, 0.02-0.10 mol/L NaOH	%43.20'den %88.44'e artış	Li ve ark. (2017)
Fıstık unu	24 kHz, 100% genlik (100 µm), 15 dakika, 1:10 un:su oranı, pH 9.0	Klasik ekstraksiyona oranla %136 artış	Ochoa-Rivas ve ark. (2017)
Soya	20 kHz, 400 W, 1 dakika, 1:6 soya unu:saf su oranı, pH 9.0	%50	Preece ve ark. (2017)
Yağsız fıstık posası	20 kHz, 30 W/g, 15 dakika, pH 6.8-10.0	%10.6 artış	Nguyen ve Lee (2019)
Yağsız soya unu ve kabuğu	20 kHz, un için 2 dakika 360 J/mL, kabuk için 4 dakika 720 J/mL, pH 8.5	Un ve kabuk için sırasıyla %10 ve %17 artış	Rahman ve ark. (2021)
Nohut	20 kHz, 750 W, %33.7 genlik (38.42 µm), 13.5 dakika, katı:çözgen 1:11.5 g/mL, pH 9.6	%82.6	Wang ve ark. (2020b)
Pirinç kepeği	20 kHz, 200 W, 10 dakika, 0.5:10 katı:çözgen oranı, pH 10.0	%11.7	Bedin ve ark. (2020)
Ceviz posası	20/40 kHz (ikili frekans), 80 W/L, 45 dakika, katı:çözgen 1:20 g/ml, 46.6°C	%91.23	Golly ve ark. (2020)
Ayçiçeği posası	20/40 kHz (ikili frekans), 220 W/L, 15 dakika, 45°C pH 8.0	%28'den %55'e artış	Dabbour ve ark. (2018)
Bakla	24 kHz, 100 W, 5-60 dakika, pH 11.0	%22 verim ve %85 saflık	Badjona ve ark. (2024)

2.2.3 Enzimatik ekstraksiyon

Protein ekstraksiyonunda enzimatik ekstraksiyon, hücre duvarını parçalayan ve proteinlerin salınımına yardımcı olan enzimlerin kullanımını içermektedir (Jung ve ark., 2006; Gouseti ve ark., 2023). Enzimatik ekstraksiyon, hassas işlem parametreleri, uzun işlem süreleri, yüksek maliyet ve enerji tüketimi gerektirmesine rağmen, üstün kalitede protein ekstraksiyonu sağladığı için çevre üzerinde minimal etki yaratarak protein ekstraksiyonu için uygun ve yenilikçi bir seçenek olarak görülmektedir (Sari ve ark., 2013; Chandran ve ark., 2023).

Enzimatik yöntemin protein ekstraksiyonu için uygulanması ticari olarak yüksek kaliteli bitkisel proteinlerin elde edilmesi için güvenilir bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır (Liu ve ark., 2016; Ochoa-Rivas ve ark., 2017). Sert bir hücre duvarı, hücre içi proteinlerin ekstraksiyonunda engelleyici bir faktördür. Pektinaz ve karbonhidrazların hücre duvarını parçalama aktiviteleri, baklagil, yağlı tohum ve tahıl tohumlarından hücre proteinlerinin düzenli bir şekilde salınmasına yardımcı olur (Rommi ve ark., 2014). Proteazlar, proteinleri polisakkarit matrisinden ayırarak protein verimini artırır. Hücre duvarının parçalanması hücre proteinlerinin serbest bırakılmasını sağlar. Bu proteinlerin serbest kalmasının ardından, proteazlar yüksek moleküler ağırlıklı proteinleri daha küçük ve daha çözünür parçalara ayırarak uygun ekstraksiyon koşulları sağlar. Bu enzimler ayrıca, serbest kalan proteinler ile karbonhidratlar ve fitatlar gibi çeşitli hücre bileşenleri arasında kompleks oluşumunu önleyebilmektedir (Zhang ve ark., 2019b). Enzimler, optimum katalitik verimlilik sağlamak için asidik ve alkali ortamlarda çalışır. Genellikle karbonhidrazlar hafif asidik ortamlarda, birçok proteaz ise hafif alkali koşullarda işlev görür. Alkali ortamda çalışan proteazlar için optimum pH değeri 8-10 aralığında, sıcaklık ise 45-60°C olarak bildirilmiştir (Sari ve ark., 2015).

Enzimatik protein ekstraksiyonu, özellikle diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kombine olarak kullanıldığında daha verimli sonuçlar verebilen bir ön işlem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemlerde, Viscozyme® L gibi enzimler, hücre duvarını parçalayarak proteinlerin serbest bırakılmasına yardımcı olmaktadır. Enzimatik hidroliz, proteinlerin daha verimli ve spesifik bir şekilde ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. UDE gibi fiziksel yöntemler ise enzimatik işlem sırasında ultrasonik dalgaların kullanılmasıyla proteinlerin

daha hızlı ve etkin bir şekilde çözünür hale gelmesini sağlar. Kombine uygulamalar, hem enzimlerin etkinliğini artırarak ekstraksiyon verimini yükseltir hem de daha düşük enerji gereksinimi ile çevre dostu bir yöntem sunar. Böylece, geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve verimli bir protein ekstraksiyonu gerçekleştirilebilmektedir (Görgüç ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2021a).

Literatürde farklı bitkisel kaynaklardan protein ekstraksiyonu için enzimatik yöntem kullanılmıştır. Farklı proteaz (papain) ve karbonhidraz (selüloz, pektinaz, arabinoz, β -glukanaz, ksilanaz ve hemiselüloz) enzim kompleksi uygulaması pirinç kepeğinden protein ekstraksiyonu için ön işlem olarak kullanılmış ve klasik alkali ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Proteazlar en yüksek protein verimini sağlarken karbonhidrazlar önemli bir etki göstermemiştir (Hanmoungjai ve ark., 2002). Kabukları ayıklanmış ve bütün kanola tohumlarından elde edilen posalar protein (%36-40) ve karbonhidrat (%35) açısından zengindir. Bu posalar, protein ekstraksiyonu için selüloolitik, pektinolitik ve ksilinolitik enzimlerle ön işleme tabi tutulmuştur. Proteolitik enzimler, glukan ve pektik polisakkaritleri hidrolize ederek hücre duvarlarını parçalayıp protein ekstraksiyon verimini 1.7 kat artırmıştır. Kabukları ayıklanmış ve bütün kanola pres posalarından sırasıyla %74 ve %56 protein ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır (Rommi ve ark., 2014). Rommi ve ark. (2015) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ekstraksiyon sırasında pH'ın geri kazanılan protein konsantrelerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bulgular, pektinaz, endo- β -glukanaz ve selüloz enzimleri kullanılarak kanola posasından protein ekstraksiyonunun klasik alkali ekstraksiyon yöntemlerine göre daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, enzimatik destekli ekstraksiyon ile elde edilen proteinlerin klasik alkali ekstraksiyon ile elde edilenlere kıyasla daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu bildirilmiştir (Rommi ve ark., 2015). Yağsız arpa unundan, α -amilaz ve amiloglukosidaz kullanılarak iki enzimli ve α -amilaz, amiloglukosidaz ve β -1,3,4-glukanaz kullanılarak üç enzimin kullanıldığı işlem ile enzimatik ön işleme tabi tutularak klasik alkali ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İki enzimli işlem ile %49 protein içeren bir protein konsantresi üretilirken, üç enzimli işlem ile %78.3 içeren bir protein konsantresi elde edilmiştir (Houde ve ark., 2018). Benzer şekilde, yağsız soya unu ksilanaz, pektinaz, selüloz ve ticari karbonhidraz karışımı ile enzimatik ön işleme tabi tutulmuş ve klasik alkali ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlem

uygulanan soya ununda, ön işlem uygulanmayan örneklerle göre protein verimi %21 oranında artmıştır. Ksilanaz, pektinaz ve selüloz ile işleme tabi tutulan ve ardından 2 saatlik klasik alkali ekstraksiyon uygulanan soya ununda ise protein verimi enzimatik ön işlemsiz uygulanan 3 saatlik klasik alkali ekstraksiyona göre %13 oranında artış göstermiştir (Perović ve ark., 2020). Kırmızı deniz yosunu *Chondracanthus chamissoi* ve kahverengi deniz yosunu *Macrocystis pyrifera*, protein ekstraksiyonunun kolaylaştırılabilmesi için selüloz, pektinaz ve α -amilaz ile enzimatik ön işleme tabi tutulmuş ve klasik alkali ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlem ile *M. pyrifera* için %74.6 protein verimi elde edilirken, *C. chamissoi* için %36.1 protein verimi sağlanmıştır (Vásquez ve ark., 2019). Literatürde bazı bitkisel ürünlerden enzimatik ön işlem kullanılarak gerçekleştirilen klasik alkali protein ekstraksiyon işlemleri Çizelge 2.4'te listelenmiştir.

Enzimatik ekstraksiyon ve UDE bitkisel proteinlerin ekstraksiyonunda kombine olarak kullanılabilir. UDE gibi mekanik işlemler, enzimatik ön işlem ile kullanıldığında protein ekstraksiyon verimini ve kalitesini artırmaktadır (Nadar ve ark., 2018). UDE ve enzimatik ön işlemin protein ekstraksiyonuna getirdiği bireysel faydalar kombine edilerek hem yüksek kalitede protein izolatu elde edilmesi hem de yüksek yatırım maliyetine karşın uzun vadede düşük maliyetli üretim hedeflerine ulaşılmasının sağlanabileceği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2021). Literatürde bu iki yenilikçi yöntemin kullanıldığı çalışmalar sınırlı olsa da zamanla çalışmaların sayısının artacağı ve yöntemin geliştirilebileceği tahmin edilmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalar Çizelge 2.4 ile gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. Bitkisel kaynaklardan enzimatik ön işlem ve klasik alkali ekstraksiyon-ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemleri ile protein ekstraksiyonu

Bitkisel Materyal	Enzimatik Ön İşlem Koşulları	Ekstraksiyon Koşulları	Verim	Kaynak
Klasik Alkali Ekstraksiyon				
Pirinç kepeği	Fitaz ve ksilanaz, pH 5.0, 55°C, Substrat:enzim 7.5 (w/w), 2 saat	pH 10.0	%74.6	Wang ve ark. (1999)
Kanola	Pektinaz, selüloz ve β -glukanaz, pH 5.0, 48°C, Substrat:enzim 4 (w/w), 4 saat	pH 10.0, 30 dakika	%80–83	Zhang ve ark. (2007)
Kanola küspesi	Viscozyme® L (pH 4.5) ve Alkalaz 2.4 L (pH 8.0) (Viscozyme® L:Alkalaz 1:1), Substrat:enzim %1 (w/w), 80 dakika	pH 9.0, 15 dakika	%82.10	Niu ve ark. (2012)
Kanola, soya ve mikroalg posaları	Protex 40XL, Protex P, Protex 50FP, Protex 26L ve Protex 5L, pH 2.5-11, Substrat:enzim %5 (w/w), 2-24 saat	pH 2.5-11, 2-24 saat	Soya için %90, kanola ve mikroalg için %50-80	Sari ve ark. (2013)
Hardal unu	Viscozyme® L, Pectinex Ultra SP-L ve Celluclast 1.5 L, pH 4.8, 40°C, Substrat:enzim %1 (w/w), 3 saat	pH 11.0, 30 dakika	%60.7	Tabatabaei ve ark. (2013) de
Soya küspesi	Viscozyme® L, pH 6.2, 53°C, Substrat:enzim 4% (v/w), 2 saat	pH 9.0, 30 dakika, 60°C	%30	Figueiredo ve ark. (2018)
Kanola	Protease A-01, pH 5.7-5.8, 60°C, Substrat:enzim 1% (w/w), 1 saat	pH 9.0, 60 dakika, 50°C	%78-81	Fetzer ve ark. (2018)
Arpa	α -amilaz (5000 U/g), amiloglukosidaz (330 U/g), pH 6.5, 40°C, Substrat:enzim 10:1 (w/v), 1 saat α -amilaz, 4 saat amiloglukosidaz	pH 11.0, 120 dakika, 23°C	%49	Houde ve ark. (2018)
Badem posası	FoodPro Alkali Proteaz (580,000–650,000 DU/g), pH 8-10, 50°C, 1-2 saat	pH 9.0, 60 dakika, 50°C	%70	Souza ve ark. (2019)
Kırmızı deniz yosunu	Viscozyme® L, Celluclast® 1.5 L, Shearzyme® 500 L, Alcalase® 2.4 L FG, pH 7.0, 60°C, 0.2–0.4% (v/w), 14 saat	1 g/L N-acetyl-Lcysteine (NAC)+4 g/L NaOH, 90 dakika, 25°C	%90	Naseri ve ark. (2020)
<i>Moringa oleifera</i> yaprakları	Viscozyme® L (60 FBGU/mL), pH 5.5, 30°C, 30 dakika	pH 11.0, 30 dakika, 25°C	%14.20	Benhammouche ve ark. (2021)
Kanola	Pektinaz, pH 8.5, 25°C, 100 mg enzim/g protein, 4 saat	pH 8.5, 4 saat, 25°C	%46	Alpiger ve Corredig (2023)
Siyah fasulye	FoodPro® Alkaline Protease, pH 9.0, 50°C, 0.5% (w/w), 1 saat	pH 9.0, 60 dakika, 50°C	%81	Yang ve ark. (2024a)

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon				
Zeytin yaprağı	Celluclast 1.5 L, pH 5.0, 55°C, Enzim aktivitesi: 1500 NCU/g, Substrat:enzim 5% (v/v), 15 dakika	0.5 W/mL, 55°C, 15 dakika	1.87–6.64 mg/g protein	Vergara-Barberán ve ark. (2015)
Siyah pirinç	α -amilaz, Substrat:enzim %1, pH 7.8, 50°C, 3 saat	100 W/L, 20/35 kHz	%89.5	Yang ve ark. (2018)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Selülaz, Substrat:enzim %1 (w/w), pH 5.0, 50°C, 3 saat	1000 W, 26 dakika	%72.41	Zhang ve ark. (2018)
Pirinç kepeği	Alkalaz, 1.248 AU/100 g enzim, pH 9.8, 43°C, 98 dakika	836 W	%88	Görgüç ve ark. (2019)
Pirinç kepeği	Alkalaz, 1.82 AU/100 g enzim, pH 9.8, 43°C, 68 dakika	550 W (vakumda), 8 dakika	%66	Görgüç ve ark. (2020)
Pikan cevizi	Alkali proteaz, Substrat:enzim %1 (w/w), pH 10.0, 50°C, 15 dakika	1415 W/cm ²	%25.51	Wang ve ark. (2021)
Kinoa	Alkali proteaz, 1.668 kat, pH 10.0, 50°C, 210 dakika	400 W	%26.72	Yang ve ark. (2024b)

2.3 Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif peptitler, protein zincirlerinde başlangıçta inaktif olarak bulunan, ancak sindirim süreçleri sırasında serbest bırakıldıklarında çeşitli önemli fiziksel ve biyokimyasal özellikler gösterebilen özel protein parçacıklarıdır (Wang ve Selomulya, 2020). Bu peptitlerin, tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon, nörolojik ve inflamatuvar hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının önlenmesinde kullanılabilecek potansiyel ürünler olduğu bildirilmiştir (Udenigwe ve Aluko, 2012; Udenigwe ve ark., 2021). Kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında toksisite riski taşımayan biyoaktif peptitler farklı gıda kaynaklarından elde edilebilir. Ayrıca, biyoaktif peptitlerin yaşlanmayı geciktirici, anti-kanser, antimikrobiyal, kolesterol düşürücü ve büyümeyi tetikleyici gibi çok çeşitli etkilere sahip olduğu da bilinmektedir (Wang ve Selomulya, 2020).

Biyoaktif peptitler, tıpkı proteinler gibi biyolojik aktivitelerini gösterebilecek üç boyutlu yapılar oluştururlar ve bu nedenle gıdaların üretimi, taşınması ve depolanması sırasında, ayrıca sindirim sisteminde çeşitli yapısal değişikliklere uğrayabilirler. Bu yapısal değişikliklerin sıcaklık, pH ve enzim aktivitesi gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (Wickham ve ark., 2009; McClements, 2018). Vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu düşünülen biyoaktif peptitler, proteinlerin özel parçalanma ürünleridir ve amid ya da peptit bağları ile birbirine bağlı amino asitlerden

oluşan organik maddelerdir. Bu peptitler, hormon ya da ilaç benzeri aktiviteler gösterebilme yeteneğine sahip olmaları ile dikkat çekmektedir. Genellikle 2-20 amino asit uzunluğunda olan biyoaktif peptitler, sindirim sisteminde enzimatik hidroliz yoluyla oluşarak kan dolaşımına geçebilir ve vücutta sistematik fayda sağlayabilirler (Möller ve ark., 2008).

2.3.1 Biyoaktif peptit üretimi

Proteinler, diyet alanında fizyolojik olarak aktif bileşenler olarak giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Gıdalarda doğal olarak bulunan pek çok proteinin fizyolojik aktiviteleri, özellikle *in vitro* ve *in vivo* enzimatik hidroliz işlemleri sonrası belirgin hale gelmektedir. Son yıllarda, bitkisel proteinlerin zengin bir biyoaktif peptit kaynağı olduğu ortaya konmuştur (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Gıda kaynaklı biyoaktif peptitler, metabolizma üzerinde düzenleyici etkiye sahip olup bitkisel ve hayvansal kaynaklılardan elde edilebilmektedirler (Hartmann ve Meisel, 2007). Protein zincirinde inaktif durumda bulunan bu peptitler, sindirim enzimleri veya proteolitik mikroorganizmaların salgıladığı enzimler aracılığıyla, ya da fermentasyon yolu ile hidroliz edilerek aktif hale gelmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Özellikle süt ürünlerinden elde edilen bu peptitlerin yanı sıra yumurta, süt, balık ve et gibi hayvansal kaynaklı proteinler ile soya ve buğday gibi bitkisel proteinler de biyoaktif özellikler göstermektedir (Hartmann ve Meisel, 2007). Hidroliz için kullanılan enzimler, işleme koşulları ve elde edilen peptitlerin boyutu dahil olmak üzere çeşitli faktörler peptitlerin biyoaktif özelliklerini etkilemektedir. Uygun bir gıda proteini seçildikten sonra, ilgi duyulan peptitleri serbest bırakmak için tek veya birden fazla spesifik veya spesifik olmayan proteazlar kullanılarak enzimatik hidroliz gerçekleştirilir. Biyoaktif peptitlerin üretiminde dikkate alınması gereken bazı faktörler arasında hidroliz süresi, proteinlerin hidroliz derecesi, enzim-substrat oranları ve proteinin hidroliz öncesinde ön işleme yer alır (Inouye ve ark., 2009).

Gıda proteininden türetilen peptit araştırmalarında sıklıkla karşılaşılan zorluk, güçlü biyoaktiviteye sahip yüksek verimli peptit ürünleri elde etmektir. Bu sınırlama, enzimatik gıda proteini hidrolizatlarının daha fazla işlenmesine yol açar. Bu nedenle protein hidrolizinden sonra elde edilen peptit ürünü, biyoaktiviteyi arttırmak amacıyla saflaştırma işlemlerine tabi tutulur. Membran ultrafiltrasyonu ve jel filtrasyon kromatografisi,

tanımlanmış moleküler ağırlık aralıklarındaki peptitleri konsantre etmek için, özellikle *in vivo* proteolitik sindirime daha fazla dayanabilen düşük moleküler ağırlıklı peptitler içeren fraksiyonlar elde etmek için kullanılmaktadır. Ters fazlı HPLC, özellikle peptitlerin yapı-fonksiyon özelliklerini incelerken, peptitleri hidrofobik özelliklerine göre parçalamak için kullanılmaktadır (Pownall ve ark., 2010). Belirli net yüklere sahip peptit fraksiyonları seçici iyon değişim kolonları kullanılarak kromatografi ile elde edilebilir (Li ve Aluko 2005; Pownall ve ark., 2011). Elektrodializ-ultrafiltrasyon olarak bilinen yeni bir membran teknolojisi, tanımlanmış moleküler boyutlardaki katyonik, anyonik ve nötr peptitleri ayırmak için kullanılmıştır. Bu yöntem, düşük moleküler boyutlu biyoaktif peptitlerin net yüklerle seçici olarak ayrılması ve konsantre edilmesinde yüksek verimlilik göstermiştir (Firdaous ve ark., 2009; Doyen ve ark., 2011). Ek olarak, bitkisel proteinlerden enzimatik hidroliz yolu ile elde edilen hidrolizatların aktif karbon ile doldurulmuş bir kolondan geçirilmesi veya basitçe aktif karbon ile karıştırılması yoluyla biyoaktif peptitlerin elde edildiği çalışmalar mevcuttur (Adachi ve ark., 1993; Udenigwe ve Aluko 2010).

Biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteleri, antimikrobiyal özellikleri ve anti-diyabetik etkileri, peptitlerin amino asit dizilimlerine bağlıdır ve bu peptitlerin birden fazla fonksiyonel özellik gösterdiği bilinmektedir (Erdmann ve ark., 2008). Biyoaktif peptitlerin üretim tekniği biyoaktif peptitlerin aktivitelerini etkileyebilmektedir (Ulug ve ark., 2021). Fermantasyon yöntemi ile biyoaktif peptit üretiminin düşük verimliliği ve bu süreçte peptit oluşumunun rastgele gelişmesi nedeniyle bu yöntem endüstriyel uygulamalarda pek yaygın değildir (Raveschot ve ark., 2018). Buna karşın, kimyasal hidroliz, biyoaktif peptit üretimi için en basit ve en ekonomik yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntemde, asidik veya bazik ortamda peptit bağları kırılarak biyoaktif peptitler ve serbest amino asitler üretilir (Wang ve ark., 2017a). Ancak, kimyasal hidroliz ile biyoaktif peptit üretimini sınırlayan en büyük sorun işlem sırasında çeşitli kimyasal bileşiklerin oluşmasıdır. Güçlü kimyasallar veya solventler kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz işlemleri, yüksek sıcaklık ve pH koşulları gerektirir ve bu durum biyoaktif peptitlerin biyokimyasal özelliklerini olumsuz etkileyerek fonksiyonel özelliklerin azalmasına yol açabilir (Kristinsson ve Rasco, 2000). Bu nedenlerden ötürü, biyoaktif peptitlerin üretimi için en uygun yöntem olarak enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Enzimatik hidroliz yöntemi, enzim aktivitesi, substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık

gibi işlem değişkenlerinin kolayca kontrol edilebilmesi sayesinde hem literatürde hem de endüstride biyoaktif peptit üretiminde en yaygın kullanılan yöntem haline gelmiştir (Zambrowicz ve ark., 2013). Bu yöntemin biyoaktif peptit üretiminde tercih edilmesinin başlıca sebepleri arasında toksik kimyasalların ortamda bulunmaması, organik solventlerin kullanılmaması ve yüksek verim sayılabilir (Marciniak ve ark., 2018). Böylece, enzimatik hidroliz, hem çevre dostu bir yaklaşım sunmakta hem de sağlık açısından faydalı biyoaktif peptitlerin üretiminde etkili bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

2.3.2 Enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptit üretimi

Son yıllarda, insan sindirim sistemini taklit eden sistemlerin oluşturulmasıyla biyoaktif peptitlerin biyoyararlılıklarını inceleyen çalışmaların sayısı artmaktadır (Ulug ve ark., 2021). Biyoaktif peptitler, proteinlerin proteolitik enzimler aracılığıyla ardışık olarak hidroliz edilmesiyle küçük fraksiyonlara ayrılarak üretilmektedir (Singh ve ark., 2021). Hayvansal kaynaklı enzimler arasında pepsin, tripsin ve kimotripsin; bitkisel kaynaklı enzimler arasında ise bromelain, papain ve fisin bulunmaktadır. Ayrıca, mikrobiyal kaynaklı enzimler de biyoaktif peptit üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde biyoaktif peptit üretiminde en çok kullanılan ticari ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerden biri alkalazdır. Bu enzimi flavourzyme, nötraz ve protamex izlemektedir. Hayvansal kaynaklı enzimler olan pepsin, tripsin ve kimotripsin de mikrobiyal kaynaklı enzimler gibi sıkça kullanılmaktadır. Bununla birlikte, papain ve bromelain gibi bitkisel kaynaklardan üretilen enzimler biyoaktif peptit üretiminde daha az tercih edilmektedir. (Pihlanto-Leppälä, 2000; Anusha ve Bindhu, 2016; Ohata ve ark., 2016). Antioksidan özelliklere sahip biyoaktif peptitlerin üretiminde saf veya ticari enzimler kullanılabileceği gibi farklı enzim karışımları da tercih edilebilmektedir (Sánchez ve Vázquez, 2017). Literatürde farklı enzimler kullanılarak biyoaktif peptitlerin üretildiği çalışmalar mevcuttur.

Esteve ve ark. (2015) zeytin çekirdeklerinden beş farklı proteaz kullanarak antioksidan ve anti-diyabetik etkiye sahip biyoaktif peptitler üretmiştir. Bu çalışmada, alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizatın en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenirken, termolisin enzimi ile elde edilen hidrolizatların en yüksek anjiyotensin dönüştürücü

enzim (ACE) inhibisyon kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, aynı protein hidrolizatının farklı enzimlerle hidrolizasyonu sonucunda farklı özellikte biyoaktif peptitlerin oluşabileceğini göstermiştir. González-García ve ark. (2014) erik çekirdeklerinden alkalaz, termolisin, flavourzyme ve proteaz P enzimlerini kullanarak ultrasonik destekli enzimatik hidroliz yöntemiyle biyoaktif peptit üretmişlerdir. Alkalaz ile elde edilen hidrolizatların, diğer enzimlerle elde edilen hidrolizatlara kıyasla en yüksek antioksidan ve anti-diyabetik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ultrasonikasyon işleminin tüm enzimler için hidroliz süresini kısalttığı gözlemlenmiştir. de Castro ve Sato (2014) soya protein izolatından mikrobiyal proteazları kullanarak antioksidan kapasiteye sahip biyoaktif peptitler üretmişlerdir. Yapılan çalışmada, substrat ve enzim konsantrasyonları ile hidroliz süresi gibi işlem parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve DPPH radikal süpürücü aktivitesi yanıt olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, flavourzyme soya protein izolatından biyoaktif peptit üretimi için en uygun enzim olarak belirlenmiştir. Soya protein izolatlarından pepsin, tripsin, alkalaz ve proteaz P kullanılarak antioksidan etkiye sahip biyoaktif peptitlerin üretildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur (Chen ve ark., 2002; Wu ve Ding, 2002; Tsuruki ve ark., 2003; Gouda ve ark., 2006). Yapılan bu çalışmalar, farklı dizilimlere sahip peptitlerin üretildiğini ve bu peptitlerin antioksidan ve anti-diyabetik etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Karamač ve ark. (2016) ise keten tohumu protein izolatlarından tripsin, papain, pankreatin, alkalaz ve flavourzyme enzimlerini kullanarak antioksidan etkiye sahip biyoaktif peptitlerin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin eldesinde en düşük etkinin papainle sağlandığı, alkalaz ve pankreatin enzimlerinin ise en yüksek antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin üretimini gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Ayrıca, elde edilen hidrolizatların, hidroliz derecesi veya biyoaktif peptitlerin moleküler ağırlıklarının antioksidan aktivite ile doğrudan ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Alkalaz hidrolizatından elde edilen 6.5 kDa'dan daha küçük fraksiyonların, pankreatin ile elde edilen 1 kDa'dan daha küçük fraksiyonlarla benzer antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. En yüksek hidroliz derecesine sahip enzim flavourzyme olmasına rağmen, en yüksek antioksidan kapasiteye sahip biyoaktif peptitlerin alkalaz ve pankreatin enzimleri ile elde edildiği gözlemlenmiştir (Karamač ve ark. 2016). Segura-Campos ve ark. (2013) çiya tohumu protein izolatlarından alkalaz ve flavourzyme enzimleri kullanarak ACE inhibisyon aktivitesine sahip protein

hidrolizatları üretmiştir. Çalışmanın sonuçları, öncelikle alkalaz ardından flavourzyme kullanılarak elde edilen hidrolizatların yüksek ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu ve bu ürünlerin fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Chalé ve ark. (2016) *Mucuna pruriens* (kadife fasulye) tohumlarından pepsin-pankreatin ve alkalaz-flavourzyme enzim karışımları kullanarak biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada, farklı enzim karışımları ile elde edilen hidroliz derecelerinin birbirinden farklı olduğu, dolayısıyla oluşan peptit fraksiyonlarının da değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Mulla ve Ahmed (2019) tere tohumu protein izolatından alkalaz enzimi ile biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmişler ve elde edilen protein hidrolizatlarının karakterizasyonunu yaparak, emülsifikasyon ve köpük özellikleri ile antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçlara göre, alkalaz enzimi kullanılarak oluşturulan hidrolizatların antioksidan aktiviteleri hidroliz derecesinin artışıyla önemli ölçüde yükselmiştir. Chai ve ark. (2019) sinameki tohumu protein izolatını kullanarak alkalaz enzimi ile biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmiş ve elde edilen peptitlerin gastrointestinal sindirim sistemi modelinde stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Castillo ve ark. (2017) bamya tohumlarından elde edilen protein izolatını pepsin ve α -kimotripsin enzimleri kullanarak hidrolize etmiş ve ACE inhibisyonuna sahip biyoaktif peptit üretimini gerçekleştirmiştir. Çalışmanın bulguları, α -kimotripsin enzimi ile oluşturulan biyoaktif peptit fraksiyonlarının pepsin ile üretilenlere göre daha yüksek ACE inhibisyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Kareem ve ark. (2018) pepsin, tripsin ve papain enzimlerini kullanarak bamya tohumu protein izolatından biyoaktif peptit üretimini gerçekleştirmiştir. Elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve pepsin ile üretilen hidrolizatların, tripsin veya papain ile üretilenlere göre daha yüksek hidroliz derecesi ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, protein hidrolizatlarının protein izolatlarına kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Kheeree ve ark. (2020) fesleğen tohumu protein izolatından alkalaz enzimi ile biyoaktif peptit üretim sürecinin optimizasyonunu ACE inhibisyon aktivitesi ve hidroliz derecesi yanıtlarını kullanarak gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada, 55°C sıcaklık, 103 dakika inkübasyon süresi ve %7.0 (w/v) enzim:substrat oranı ile en yüksek hidroliz derecesi ve ACE inhibisyonu sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, fesleğen tohumlarının anti-hipertansif özelliklere sahip biyoaktif peptitlerin üretiminde önemli bir hammadde olarak değerlendirilebileceğini ortaya

koymuştur. Bir başka çalışmada, Afifah ve Gan (2016) alkalaz enzimi ile fesleğen tohumu protein izolatından biyoaktif peptit üretimini gerçekleştirmiş ve örneklerin antioksidan aktivitelerini incelemiştir. Elde edilen bulgular, fesleğen tohumlarının hem antioksidan aktiviteye hem de α -amilaz inhibisyon aktivitesine sahip biyoaktif peptit fraksiyonlarına sahip olduğunu göstermiştir.

Literatürde gerçekleştirilen çalışmalar değerlendirildiğinde, bitkisel kaynaklı protein izolatlarından biyoaktif peptit üretiminde alkalaz ve flavourzyme gibi ticari enzimler ile pepsin enziminin ne çıktığı görülmektedir. Bu enzimlerin tek başına ya da farklı oranlarda karışımlarının kullanımı ile bitkisel kaynaklardan biyoaktif peptitlerin üretilebileceği düşünülmektedir. Farklı enzimlerin birlikte kullanımı ile elde edilen biyoaktif peptitlerin fonksiyonel gıdalarda kullanım potansiyeli ve sağlığa olan katkıları üzerine daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca, her bir enzim karışımının biyoaktif peptitlerin biyoyararlılığı ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri incelenerek biyoaktif peptitlerin geliştirilmesi ve çeşitli sağlık yararlarının optimize edilmesi hedeflenmelidir.

2.3.3 Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel zellikleri

Biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, anti-inflamatuar aktivite, anti-hipertansif aktivite, immnomodlatr aktivite ve anti-kanser aktivite gibi birçok farklı karakteristik özelliği bulunmaktadır. Bu zellikler sayesinde literatürde ve endüstride biyoaktif peptitler ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Reaktif oksijen türleri hücre hasarına yol açarak kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyona neden olmaktadır (İbrahim ve ark., 2018). Biyoaktif peptitlerin antioksidatif özellikleri onların bileşimleri, oluşum süreçleri ve hidrofobiklikleri ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, histidin, glutamik asit, prolin, tirozin, sistein, metiyonin ve fenilalanin gibi amino asitler antioksidan özellikleri ile dikkat çeken önemli bileşenlerdir (Grska-Warsewicz ve ark., 2018). Amino asitler aktivitelerini gerçekleştirmek için pro-oksidan metal iyonlarına bağlanabilir, hidroksil radikallerini temizler ve/veya lipid peroksidasyonunu engelleyebilirler. Bu etkileşimlerin sonucunda her bir amino asit, türüne bağlı olarak benzersiz bir antioksidan olarak katkıda bulunur (Li ve ark., 2008). Çoğu antioksidan peptit, 4-16 amino asit kalıntısı içerir ve 0.4-2 kDa aralığında bir

moleküler ağırlığa sahiptir. Peptitlerin moleküler boyutu hem hedef bölgelere giden yolları hem de mide-bağırsak sindirim sürecini etkileyerek potansiyel olarak *in vivo* antioksidan aktiviteyi artırır (Toldrá ve ark., 2018). Tirozin içeren peptitler, antioksidan etkilerini esas olarak hidrojen atomu transferi yoluyla gösterirken, sistein, triptofan ve histidin içeren peptitler çoğunlukla tek elektron transferi yoluyla etki gösterir (Esfandi ve ark., 2019). Tirozin ve fenilalanin gibi aromatik amino asitler elektron eksikliği olan radikallere proton verme konusunda oldukça etkilidir. Bu özellik, biyoaktif peptitlerin radikal temizleme yeteneklerini önemli ölçüde artırır. Histidin içeren peptitlerin antioksidan kapasitesinin, hidrojen donörlüğü ve lipit peroksid radikalini yakalama özellikleri ile bağlantılı olduğu doğrulanmıştır (Ajibola ve ark., 2011). Sülfidril grubu içeren sisteinlerin ise radikallerle birincil reaksiyonları nedeniyle antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir (Sarmadi ve Ismail, 2010). Chen ve ark. (2022), siyah fasulye protein hidrolizatları ve biyoaktif peptit fraksiyonlarının antioksidan özelliklerini ortaya koymuşlardır. Bhadkaria ve ark. (2023), fasulye (*Vigna aconitifolia* (Jacq.)) tohumu protein izolatından alkalaz kullanarak antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Trigui ve ark. (2021), çörekotu proteinlerinin hidrolizasyonunu Savinase® kullanarak gerçekleştirmişler ve antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif peptit üretmeyi başarmışlardır. Xue ve ark. (2015) nohut proteininden elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitesini ortaya koymuşlardır. Lu ve ark. (2019) ile Chatterjee ve ark. (2015) susam proteininden elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, soya fasulyesi, buğday tohumu, kenevir tohumu, pirinç kepeği, susam kepeği, buğday kepeği ve kolza tohumu gibi endüstriyel gıdalardan ve yan ürünlerinden elde edilen bitki bazlı proteinler antioksidan özelliklere sahip biyoaktif peptitler içermektedir (Görgüç ve ark., 2020).

Antimikrobiyal özellikli biyoaktif peptitler, kısa (20-46 amino asit kalıntısı), bazik (lizin veya arjinin bakımından zengin) ve amfipatik özellikte olanlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bu peptitlerde genellikle lösin, izolösin, valin, fenilalanin ve triptofan gibi hidrofobik kalıntılar bol miktarda bulunur (Haney ve Hancock, 2013). Antimikrobiyal peptitler hücre zarını etkileyerek ve hücre bölünmesi gibi biyolojik süreçleri değiştirerek etki gösterir (Yadavalli ve ark., 2016). Antimikrobiyal peptitlerin, bakteriyel membranlar içinde kanallar veya gözenekler oluşturduğu, anabolik aktiviteleri inhibe ettiği, gen ekspresyonunda ve sinyal iletiminde değişiklikler yaptığı ve anjiyogenezi teşvik ettiği

varsayılmaktadır. Örneğin, sütün antimikrobiyal etkisi kapsamlı araştırmalarla kanıtlanmıştır. Gastrointestinal sistemde laktoferrisine hidrolize edilen laktoferrin, çeşitli diğer biyoaktif peptitlerin sentezine önemli bir katkıda bulunur ve kendi başına antimikrobiyal yeteneğe sahiptir (Kamali ve Ehsani, 2017). Ayrıca, deniz ürünlerinde de antimikrobiyal peptitler keşfedilmiştir. Hamsi pişirme atık suyundan izole edilen bir peptit, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmiştir (Tang ve ark., 2015). Aguilar-Toalá ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, <3 kDa fraksiyonundaki çiya protein hidrolizatının, 3-10 kDa fraksiyonundan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Arulrajah ve ark. (2020) kenaf tohumu proteinlerinden *L. casei* ve *L. pentosus* kullanarak fermentasyon yolu elde edilen biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal özelliklerini bildirmişlerdir. Song ve ark. (2020) pamuk tohumu proteininden alkalaz kullanılarak elde edilen biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Bazı bitkilerden elde edilen peptitlerin anti-inflamatuar etkiler sergilediği belirlenmiştir (Liu ve ark., 2022a). *In vitro* araştırmalar, mısır ve soya fasulyesi gibi protein hidrolizatlarının güçlü bir anti-inflamatuar etkisi olduğunu göstermektedir (Mochizuki ve ark., 2010; Kovacs-Nolan ve ark., 2012). Reyes-Díaz ve ark. (2019) tarafından yapılan bir derlemede, baklagil proteinlerinden özellikle soya fasulyesi ve barbunya gibi kaynaklardan elde edilen peptitlerin, prostaglandin E2 (PGE2), nitrik oksit (NO), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz 2 (COX-2), sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli inflammatuar göstergeleri düzenleyebileceği belirtilmiştir. Şimdiye kadar, lunasin, VPY ve γ -glutamil peptitlerinin anti-inflamatuar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bu peptitlerin etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Ayrıca, anti-inflamatuar aktiviteye sahip peptitleri içeren hidrolizatlar ve tek tek peptitler hakkında daha fazla bilgi toplanması gerektiği vurgulanmıştır.

Modern toplumda yaşam tarzındaki değişiklikler nedeniyle hipertansiyon tedavisinde kan basıncını düşürücü faydaları olan fonksiyonel gıdalara duyulan ihtiyaç artmaktadır. Hipertansiyon, kalp ve böbrek hastalıkları, ateroskleroz ve felç gibi birçok sağlık sorununa yol açabilmektedir (Lee ve Hur, 2017). Protein hidrolizatları tarafından üretilen

anti-hipertansif peptitler ACE inhibitörleri olarak da bilinir ve bu peptitler hipertansiyonla ilgili en çok çalışılan bileşikler arasında yer almaktadır (Iwaniak ve ark., 2014). ACE anjiyotensin I'nin anjiyotensin II'ye dönüşümünü katalize ederek kan basıncının yükselmesine neden olduğu için önemli bir etkiye sahiptir. C-terminalindeki aromatik amino asit kalıntıları ve N-terminalindeki hidrofobik amino asit kalıntıları peptitlerin ACE üzerindeki inhibisyonunu daha etkili hale getirmektedir (Acquah ve ark., 2018). Farklı bitkisel kaynaklar anti-hipertansif aktiviteye sahip aktif peptitler içermektedir. Örneğin bezelye (izolösin-arginin, lizin-fenilalanin ve glutamik asit-fenilalanin), soya fasulyesi (aspartik asit-lösin-prolin ve aspartik asit-glisin) ve pirinç (izolösin-histidin-arginin-fenilalanin) bu grupta yer almaktadır. (Görgüç ve ark., 2020). Marambe ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, yağı alınmış keten tohumu proteini hidrolizatının ve hidrolizattan elde edilen tripeptitlerin ACE aktivitesini azalttığı ve kardiyovasküler hastalık riskini düşürdüğü tespit edilmiştir. Wang ve ark. (2017b) pirinç kepeğinden elde edilen bir biyoaktif peptidin güçlü bir ACE inhibitör etkisine sahip olduğunu belirlemiştir. Tuomilehto ve ark. (2004) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise, süttten elde edilen biyoaktif tripeptitlerin orta derecede hipertansiyonu olan hastalarda kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur. Mune ve ark. (2018) Bambara fasulyesi proteinlerinden alkalaz, tripsin ve termolisin enzimleri ile elde ettikleri biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerini tespit etmişlerdir. Bhadkaria ve ark. (2023) fasulye tohumu protein izolatından alkalaz kullanarak biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmişler ve <3 kDa peptit fraksiyonunun anti-hipertansif aktivitesini ortaya koymuşlardır. Segura-Campos ve ark. (2011) börölce protein izolatından flavourzyme kullanılarak elde ettikleri biyoaktif peptitlerin ACE inhibisyonu sağladığını bildirmişlerdir.

İmmünomodölatör aktivite, insan bağışıklık sisteminin doğru çalışması için gereklidir. Biyoaktif peptitlerin immünomodölatör etkisi, sitokin regölasyonu, antikor oluşumu, reaktif oksijen türleri yoluyla bağışıklık sisteminin uyarılması, tübülindeki konformasyonel değışiklikler ve protein sentezinin inhibisyonu ile ilişkilidir (Udenigwe ve Aluko, 2012). Ayrıca, amino asit içeriğı, dizisi, uzunluğu, yükü, hidrofobikliği ve peptit yapısı immünomodölatör fonksiyonla bağlantılıdır. Düşük molekül ağırlıklı soya proteini hidrolizatlarının ve birçok pozitif yüklü peptidin immün modölasyonunu uyardığı kanıtlanmıştır (Kong ve ark., 2008). Kovacs-Nolan ve ark. (2012) ve Chatterjee

ve ark. (2018) soya proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin imm nomod lat r etkisini ortaya koymuştur. Tok ve ark. (2021) arpa proteini hidrolizatlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin benzer şekilde imm nomod lat r aktivitesini bildirmişlerdir. Literatürde ay ı eği proteini, ceviz proteini, keten tohumu proteini ve pirin proteini gibi bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoaktif peptitlerin imm nomod lat r aktiviteleri tespit edilmiştir (Matsumoto ve ark., 2001; Ma ve ark., 2015; Xu ve ark., 2019; Velliquette ve ark., 2020).

Gıdalardan elde edilen protein hidrolizatlarından anti-kanser özelliklere sahip peptitlerinin üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle pirinç ve soya proteini hidrolizatlarının anti-kanser etkileri daha önce ortaya konmuştur. Pirinçten anti-kanser özellikli biyoaktif peptitler, pirinç kepeği proteinlerinin alkalaz ile hidrolizi ile üretilmiştir (Kannan ve ark., 2010). Peptitlerle ilgili anti-kanser araştırmalarının çoğu lunasin üzerinde yoğunlaşmıştır. Lunasinin anti-kanser özellikleri, hücre adezyonu için gerekli olan arjinin-glisin-aspartik asit dizisi ve 9 aspartik asit kalıntısına sahip bir poliaspartik asit zinciri içermesine bağlıdır. Bu peptit soya veya buğday tanelerinden türetilmektedir (Dia ve Mejia, 2011; Bhandari ve ark., 2020). Fermente soya fasulyesi ekstraktlarının MCF7 meme kanseri hücre hattının çoğalmasını etkilediği ve gen ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu ekstraktların dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) yolunu uyarak meme kanserini etkili bir şekilde önleyebileceğini göstermiştir (Hwang ve ark., 2011). Badger ve ark. (2005) ise soya peptit konsantrelerinin meme, prostat ve mide-bağırsak kanserlerinin görülme sıklığını azalttığını belirtmişlerdir. Soya peptidi konsantrelerinin kanser vakalarını %80 oranında azaltabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca, siyah soya fasulyesi, maş fasulyesi küspesi ve Adzuki fasulyesinden elde edilen peptitlerin 200-600 g/mL konsantrasyonlarda kanser hücrelerini baskıladığı bulunmuştur (Chen ve ark., 2017). Ancak, bu anti-kanser peptitleri yalnızca *in vitro* olarak incelenmiş olup, peptitlerin biyoyararlılığı konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Zaky ve ark., 2022).

Anti-diyabetik aktiviteye sahip ve bitkisel kaynaklardan üretilen farklı biyoaktif peptitler literatürde mevcuttur. Vilcacundo ve ark. (2017), kinoa proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Mudgil ve ark. (2023) keten tohumu ve  iya tohumu proteinlerinden alkalaz, bromelain ve papain

kullanarak elde ettikleri protein hidrolizatları için yüksek α -glukosidaz inhibitör etkisi bildirmişlerdir. Awosika ve Aluko (2019) sarı bezelye protein hidrolizatına uygulanan ultrafiltrasyon sonucunda elde edilen fraksiyonların anti-diyabetik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ngoh ve ark. (2017) fasulye protein izolatından Protamex kullanılarak α -amilaz inhibitör peptitlerini başarıyla elde etmişlerdir. Literatürde ayrıca şelatlama aktivitesine sahip peptitlerin varlığı bildirilmiştir. Bamdad ve Chen (2013) arpa protein hidrolizatını ultrafiltrasyon yöntemiyle çeşitli fraksiyonlara ayırmışlar ve küçük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin demir için yüksek şelatlama aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Chen ve ark. (2022) siyah fasulye protein hidrolizatları ve biyoaktif peptit fraksiyonlarının şelatlama aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Şelatlama aktivitesine sahip biyoaktif peptitler ayrıca susam (Wang ve ark., 2012), nohut (Megías ve ark., 2007; Torres-Fuentes ve ark., 2015) ve ayçiçeği (Megías ve ark., 2008) gibi bitkisel kaynaklardan da elde edilmiştir.

Biyoaktif peptitler, fonksiyonel özellikleri sayesinde beslenme ve sağlık alanlarında büyük bir potansiyele sahiptir. Antimikrobiyal özellikleri ile gıda güvenliğine katkı sağlayarak gıdalarda raf ömrünü uzatma potansiyeli taşırlar. Bu peptitlerin gıda endüstrisinde doğal koruyucu maddeler olarak kullanımı, gıda güvenliğini artırmak ve koruyucu madde ihtiyacını doğal kaynaklarla karşılamak açısından umut vericidir. Ayrıca, anti-inflamatuvar özellikleriyle sağlığı desteklemekte ve diyet takviyeleri ya da doğal tedavi seçenekleri olarak değerlendirilebilmektedirler. Anti-hipertansif etkileri ise, özellikle düşük molekül ağırlıklı peptitlerin ACE inhibisyonu yoluyla kan basıncını düşürmesi şeklinde kendini gösterir ve hipertansiyonun önlenmesinde potansiyel bir tedavi yolu sunar. Bu durum, fonksiyonel gıdaların gelecekte hipertansiyon gibi kronik hastalıkların önlenmesinde daha geniş kapsamlı kullanımını desteklemektedir. Bitkisel kaynaklı biyoaktif peptitler için yeni kaynak arayışları devam ederken, fesleğen ve tohumları gibi biyoaktif bileşen içeriği zengin bitkilerin de değerli birer peptit kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

2.4 Fesleğen ve Fesleğen Tohumu

Fesleğen olarak bilinen *Ocimum basilicum* L., Labiatae familyasına ait tek yıllık bir baharat bitkisidir. Fesleğen adı, Yunanca ‘Kral’ anlamına gelen ‘Basileus’ kelimesinden

türetilmiştir ve tıp, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrilerindeki geniş kullanım alanı nedeniyle sıklıkla “bitkilerin kralı” olarak anılmaktadır (Bilal ve ark., 2012). Bu bitki esas olarak Hindistan, Afrika ve Güney Asya gibi sıcak ve tropik bölgelerden gelmektedir (Putievsky ve Galambosi, 1999). Günümüzde dünyanın her yerinde bulunabilmektedir (Nadeem ve ark., 2020). *O. basilicum*, Fransa, Macaristan, Yunanistan ve diğer Güney Avrupa ülkeleri ile Kuzey ve Güney Amerika dahil olmak üzere pek çok sıcak ve ılıman ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir (Pushpangadan ve ark., 2012).

Fesleğen, antik çağlardan beri farklı şekillerde kullanılmıştır. Yapraklar gıdalara belirgin bir tat ve aroma katmak için taze veya kurutulmuş olarak kullanılabilir. Aynı zamanda içeceklerin, likörlerin, sirkelerin, çayların ve peynirlerin imalatında da kullanılmaktadır. Fesleğen bitkisinin dalları ve yumuşak odunsu sapları, farklı gıdalara tatlandırıcı madde olarak eklenebilirken, çiçekleri çeşitli yemek ve içeceklerde kullanılmaktadır (Nadeem ve ark., 2020). Yaprak ve çiçeklerden elde edilen uçucu yağlar gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır (Khaliq ve ark., 2017). Diyet lifi kaynağı olarak unlu mamullere bütün olarak veya öğütülerek eklenir. Tohumlar, görsel ve fonksiyonel amaçlarla meyve bazlı içecekleri zenginleştirmek için de kullanılmaktadır (Hajmohammadi ve ark., 2016; Naji-Tabasi ve ark., 2017). Fesleğen tohumları diyet lifi açısından zengin olup, fonksiyonel bir bileşen olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Fesleğen tohumlarından elde edilen müsilaj geniş çapta incelenmiş ve emülsifiye edici, köpürtücü, koyulaştırıcı, stabilize edici, viskozite artırıcı ve jelleştirici özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Mathews ve ark., 1993; Osano ve ark., 2014; Naji-Tabasi ve ark., 2016; Naji-Tabasi ve ark., 2017; Kim ve ark., 2020). Fesleğen tohumları yalnızca besleyici değeri açısından değil, aynı zamanda anti-diyabetik, antimikrobiyal, antioksidan ve anti-kanser aktiviteleri gibi sağlık yararları açısından da önemlidir (Imam ve ark., 2012; Gajendiran ve ark., 2016).

Fesleğen tohumlarının boyutları, ekildiği bölgeye ve geldiği ülkeye göre değişiklik göstermektedir. Fesleğen tohumlarının görüntüsünde genel olarak siyah renk ve gözenekli yüzeyler görülmektedir (Uematsu ve ark., 2020). Aynı ülkeden (Sırbistan) ancak farklı bölgelerden toplanan tohumların uzunluk, genişlik ve kalınlık açısından önemli farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Öte yandan, aynı çalışmada İran fesleğen

tohumlarının Sırp fesleğen tohumlarına göre daha büyük olduğu gösterilmiştir. Boyuttaki bu farklılıkların nem ile ilişkili olduğu, nem içeriği arttıkça boyutun da arttığı bildirilmiştir (Choi ve ark., 2020). Benzer büyüklükteki iki tohumun nem içeriğinin sırasıyla %9.1 ve %5.5 olduğu bildirilmiştir (Hosseini-Parvar ve ark., 2010; Razavi ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalar, protein eksikliğinin en sık görülen yetersiz beslenme türü olduğunu ve bunun süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak birçok fizyolojik sonuca yol açabileceğini bildirmiştir (Hastreiter ve ark., 2020). Kalori değerlerinin %12'sinden fazlasını proteinden sağlayan bitki bazlı gıdalar, dikkate değer protein tedarikçileri olarak kabul edilmektedir ve bu durum, vejetaryen ve vegan beslenmeye olan ilginin arttığı günümüzde özellikle önem taşımaktadır. Sunulan veriler, tatlı fesleğen tohumlarının %10 ile %22.5 arasında değişen yüksek protein içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, fesleğen tohumlarının beslenme ve insan sağlığı açısından değerli bir protein kaynağı olduğunu ortaya koymaktadır (Calderón Bravo ve ark., 2021). Çizelge 2.5'te fesleğen tohumlarının amino asit bileşimi yer almaktadır. Calderón Bravo ve ark. (2021) fesleğen tohumlarının amino asit bileşimini farklı çalışmalardan derlemiştir. Sonuçlar, glutamik asit ve aspartik asidin *O. basilicum* tohumlarındaki esansiyel olmayan başlıca amino asitler olduğunu göstermiştir. Ayrıca, triptofan hariç tüm esansiyel amino asitlerin bu türde yüksek miktarlarda bulunması, fesleğen tohumlarının beslenme açısından değerli bir protein kaynağı olabileceğini göstermiştir (Calderón Bravo ve ark., 2021).

Fesleğen tohumları geleneksel olarak hazımsızlık, ülser, ishal, boğaz ağrısı ve böbrek bozukluklarının tedavisinde doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Hosseini-Parvar ve ark., 2010; Bilal ve ark., 2012; Mabood ve ark., 2017). Fesleğen tohumları ayrıca idrar söktürücü, ateş düşürücü, afrodizyak ve dizanteri önleyici olarak da kullanılmıştır (Bilal ve ark., 2012; Mabood ve ark., 2017). Fesleğen tohumlarından elde edilen müsilaaj, çeşitli endüstriyel ve gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. Örneğin, düşük tuzlu et ürünlerinde su bağlayıcı madde olarak (Lee ve Chin, 2020), pandispanyalarda yağ ikamesi olarak (Song ve ark., 2017) ve süt proteini ile etkileşimi sayesinde puding (süt proteini jeli), dondurma ve az yağlı yoğurt gibi ürünlerde jelleştirici ve stabilize edici bir madde olarak işlev görmektedir (Song ve ark., 2019). Fesleğen tohumu müsilaajının

ürünlerin reolojik özelliklerini iyileştirdiği, sineresisi azalttığı ve yüksek jel mukavemeti sağladığı bildirilmiştir (BahramParvar ve ark., 2012; Song ve ark., 2019; Kim ve ark., 2020). Ayrıca, ekmek ve diğer unlu mamullerin fizikokimyasal ve duyusal özelliklerini geliştirmek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Israr ve ark., 2017). Ayrıca, fesleğen tohumu yağı, yağ içeriği ve bileşimi nedeniyle endüstriyel uygulamalar için potansiyel faydalı özellikler göstermektedir (Angers ve ark., 1996). Bununla birlikte, kozmetik uygulamalar için fesleğen tohumu yağını soğuk presleme yöntemiyle elde eden bazı firmalar bulunmaktadır; ancak bu gibi ürünler gıda sınıfı standartlarına uygun değildir (Gajendiran ve ark., 2016).

Çizelge 2.5. Farklı fesleğen tohumlarının amino asit bileşimi (mg/100 mg) (Karnchanatat ve ark., 2014; Ziemichód ve ark., 2019)

Amino asit	<i>O. basilicum</i>	<i>O. tenuiflorum</i>
Aspartik asit	4.61	1.45
Serin	3.58	1.00
Glutamik asit	10.55	3.16
Glisin	3.12	0.89
Histidin	1.70	0.65
Arginin	8.48	2.05
Treonin	2.16	0.60
Alanin	2.65	0.80
Prolin	2.25	0.66
Tirozin	2.08	0.52
Valin	2.63	0.77
Lizin	1.56	0.54
İzolösin	1.91	0.54
Lösin	4.02	1.13
Fenilalanin	3.49	0.93
Sisteik asit	ND	0.58
Metiyonin sülfon	ND	0.90
Triptofan	ND	0.96

Sonuç olarak, fesleğen ve fesleğen tohumları, besin değeri, sağlık yararları ve fonksiyonellik açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Tohumların protein içeriği, amino asit profili ve sağlık yararları bu bitkinin hem gıda hem de farmasötik

endüstrilerinde önemli bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Fesleğen tohumlarının işlenmesi, depolanması ve kullanım yöntemleri üzerine daha fazla araştırma yapılması bu kaynakların potansiyelini daha iyi anlamak ve değerlendirmek için kritik öneme sahiptir.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan fesleğen tohumları insan tüketimine uygun, ilaçlanmamış şekilde Tokat'ta bulunan üreticilerden yerli tohum olarak temin edilmiştir. Öncelikle, fesleğen tohumlarının içerisindeki yabancı maddeler görsel olarak incelenmiş ve elle uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, fesleğen tohumları bir blender (Sinbo SCM 934, Türkiye) kullanılarak öğütülmüştür. Öğütülen tohumlar 630 µm çapında bir elekten geçirilmiş ve elek altına geçen fraksiyonlar toplanmıştır. Yüksek yağ içeriğine sahip fesleğen tohumlarında (%18.88±0.11) yağ giderme işlemi n-hekzan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yağı alınmış öğütülmüş fesleğen tohumu örneklerinin toplam protein içeriği %34.86±0.42 olarak belirlenmiş olup tez çalışmasında bu örnekler kullanılmıştır. Örnekler analizlerde kullanılıncaya kadar ağzı kapalı cam kavanozlarda -18°C'de depolanmıştır.

3.2 Ekstraksiyon İşlemi ve Protein İzolatlarının Üretimi

Fesleğen tohumlarından protein ekstraksiyonu öncesinde uygulanan enzimatik ön işlem için bir deneysel tasarım oluşturulmuştur (Çizelge 3.1). Enzimatik ön işlem için pH, sıcaklık, enzim miktarı ve işlem süresi bağımsız değişkenler, protein verimi ve indirgen şeker içeriği ise bağımlı değişkenler olarak tanımlanmıştır. Bağımsız değişkenlerin sınır değerleri yapılan ön denemeler neticesinde, pH 3.0-5.0, sıcaklık 35-50°C, enzim miktarı (Viscozyme® L, Novozymes, Almanya) 0.5-5.0 Fungal Beta-Glukanaz ünitesi (FBGU)/g tohum ve işlem süresi 1-4 saat olarak seçilmiştir. Enzimatik ön işlem için seçilen Viscozyme® L, selüloz, hemiselüloz ve pektinaz enzimlerinden oluşmaktadır. Çizelge 3.1'e göre enzimatik ön işlem uygulandıktan sonra, örneklerin pH'sı 9.0'a ayarlanmış ve 1 saat boyunca karıştırılarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Klasik alkali ekstraksiyonun ardından, örnekler 25°C'de 6000 rpm'de (Hettich Universal 320R, 1620A rotor, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Almanya) 15 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve süpernatant fazlar saklanmıştır.

Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen süpernatant fazlara Kjeldahl protein tayini (AOAC, 2000) uygulanarak protein içeriği belirlenmiştir. Protein miktarının hesaplanmasında 6.25 katsayısı kullanılmıştır. Ekstraksiyon verimi, öğütülmüş ve yağı alınmış fesleğen tohumlarında başlangıçta bulunan protein miktarı ile ekstraktlardaki protein miktarının oranlanması ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1).

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{\text{Ekstraktta bulunan protein (g)}}{\text{Yağı alınmış ve öğütülmüş fesleğen tohumunda bulunan protein (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

Ekstraksiyon sonrasında, sıvı fazdaki indirgen şekerler DNS (3,5 dinitrosalisilik asit) yöntemi (Miller, 1959) kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar mg glukoz/g tohum olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzimatik ön işlem için oluşturulan deneme planı

Deneme No.	pH	Sıcaklık (°C)	Enzim miktarı (FBGU/g)	Süre (saat)
1	4.0	45	2.75	3
2	5.0	45	2.75	1
3	5.0	35	2.75	3
4	3.0	45	0.50	3
5	4.0	45	2.75	3
6	5.0	45	0.50	3
7	4.0	45	5.00	5
8	5.0	45	5.00	3
9	4.0	45	0.50	5
10	4.0	35	2.75	1
11	4.0	45	5.00	1
12	4.0	45	0.50	1
13	4.0	55	5.00	3
14	3.0	55	2.75	3
15	4.0	55	2.75	1
16	5.0	55	2.75	3
17	5.0	45	2.75	5
18	4.0	35	5.00	3
19	4.0	55	0.50	3
20	4.0	35	2.75	5
21	4.0	55	2.75	5
22	3.0	45	2.75	5
23	4.0	45	2.75	3
24	3.0	45	2.75	1
25	3.0	35	2.75	3
26	4.0	45	2.75	3
27	4.0	35	0.50	3
28	4.0	45	2.75	3
29	3.0	45	5.00	3

Enzimatik ön işlemin ardından, klasik alkali ekstraksiyondan farklı olarak ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi (UDE) de gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.1'deki deneysel tasarıma göre enzimatik ön işlem ve klasik alkali ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra optimum koşul belirlenmiştir. Optimum koşulda uygulanan enzimatik ön işlemin ardından örnekler UDE işlemi uygulanmıştır. UDE işleminde, örneklerin pH'sı 9.0'a ayarlanmış ve ultrasonik prob kullanılarak %60 genlikte 10 dakika sonikasyon uygulanmıştır. UDE işleminde ultrasonik genlik, yüzde olarak ifade edilmekte olup, sonikatör probunun uzunlamasına oluşturabileceği dalga mesafesini temsil etmektedir. Çalışmada, 1/2" çapında proba sahip laboratuvar ölçekli bir sonikatör (Q 500, Q Sonica, 500 W, 20 kHz, ABD) kullanılmıştır. Ultrasonik prob sistemi, su geçirmez akustik köpükle kaplı iç duvarları olan ses geçirmez bir muhafaza içinde yer almaktadır. Sonikasyon işlemi 250 mL hacminde, 9.5 cm yükseklik ve 7.5 cm çap ölçülerine sahip borosilikat cam beherde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin aşırı ısınmasını önlemek için α değeri 0.8 olarak ayarlanmıştır ve bu değer, $\alpha = t_{açık} / (t_{açık} + t_{kapalı})$ olacak şekilde hesaplanmıştır. Burada $t_{açık}$ sonikasyonun aktif olduğu süreyi (s) ve $t_{kapalı}$ sonikasyonun pasif olduğu süreyi (s) ifade etmektedir. Ayrıca, ekstraksiyon sıcaklığının sabit tutulması (~ 25°C) amacıyla bir buz banyosu düzeneği kullanılmıştır.

Tez çalışmasında üç farklı protein izolatu üretilmiştir. İlk izolat, enzimatik ön işlem uygulanmamış ve klasik alkali ekstraksiyon ile (pH 9.0, 1 saat) elde edilen kontrol (K) örneğidir. İkinci izolat (E+KE), optimum enzimatik ön işlem koşullarında klasik ekstraksiyon (pH 9.0, 1 saat) ile elde edilmiştir. Üçüncü izolat (E+UDE) ise optimum enzimatik ön işlem koşullarında UDE işlemi (pH 9.0, %60 genlik, 10 dakika) kullanılarak üretilmiştir.

Ekstraksiyon işlemleri sonrasında, süpernatant fazlar 0.1 N ve 1 N HCl kullanılarak pH 4.0'a ayarlanmış ve fesleğen tohumu proteinleri 6 saat boyunca çöktürülmüştür. Çöktürme sonrasında, örnekler 25°C'de 9000 rpm'de 60 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant faz uzaklaştırılmış ve çökelti pH 4.0'a ayarlanmış distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Her yıkama işlemi sonrasında örnekler santrifüj işlemi (6000 rpm, 5 dakika) uygulanmıştır. Yıkanmış çökeltiler pH 7.2'deki distile su içinde çözülmüş ve -18°C'de 72 saat dondurularak kurutulmuştur (Christ Alpha 1-4 LSC Plus, Almanya). Kontrol protein izolatu (K), enzim+klasik ekstraksiyon (E+KE) ve enzim+ultrasonik destekli

ekstraksiyon (E+UDE) işlemleri ile elde edilen protein izolatlarının nem içeriği sırasıyla %3.24±0.06, %3.37±0.06 ve %3.32±0.05, protein içeriği sırasıyla %86.14±0.11, %90.08±0.61 ve %91.12±0.44, yağ içerikleri sırasıyla %0.19±0.01, %0.12±0.03 ve %0.14±0.02, kül içerikleri sırasıyla %1.14±0.21, %1.36±0.08 ve %1.38±0.07 olarak belirlenmiştir. Üç farklı protein izolatu analizler yapılana kadar -18°C’de saklanmıştır.

3.3 Protein İzolatlarının Karakterizasyonu

Üç farklı protein izolatının koagüle protein yüzdesi, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük özellikleri (köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi), emülsifikasyon özellikleri (emülsiyon aktivitesi, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon kapasitesi) ve çözünürlük özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca protein izolatlarının moleküler ağırlıkları, yapısal ve termal özellikleri ortaya konmuştur. Ek olarak enzim+ultrasonik ekstraksiyon işlemi ile üretilen protein izolatının (E+UDE) amino asit profili belirlenmiştir.

3.3.1 Koagüle protein yüzdesinin belirlenmesi

Protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, Kramer ve Kwee (1977) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 0.2 g protein izolatu, pH 7.0’da 0.025 M 10 mL sitrat-fosfat çözeltisi içinde çözülmüş ve ardından santrifüj edilmiştir. Süpernatant faza Biüret reaktifi eklenmiş ve çözelti karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Daha sonra çözelti, 100°C’de 15 dakika ısıtılmış ve ardından soğutulmuştur. Soğutma işleminin ardından ısıtma işlemi tekrar uygulanmıştır. Isıtma öncesi (A_1) ve ısıtma sonrası (A_2) örneklerin absorbanları 540 nm’de ölçülerek, % koagüle protein değeri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Koagüle protein (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.2 Su ve yağ tutma kapasitelerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının su tutma kapasitesini belirlemek için, 250 mg protein izolatına 15 mL saf su eklenmiş ve karışım vorteks (Isolab Vorteks Mikser 622.01.001, Türkiye) ile karıştırılarak örnekler oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra, örnekler 3000 rpm hızında 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant faz uzaklaştırılmış ve kalan örnek tartılmıştır. Su tutma kapasitesi, g su/g kuru örnek olarak hesaplanmıştır. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi için, su tutma kapasitesinde uygulanan yöntem su yerine natürel sızma zeytinyağı kullanılarak tekrarlanmıştır. Yağ tutma kapasitesi, g yağ/g kuru örnek olarak ifade edilmiştir (Li ve ark., 2022).

3.3.3 Köpük özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi, Timilsena ve ark. (2016) tarafından önerilen yöntemle belirlenmiştir. 20 g/L konsantrasyonundaki protein izolatı sulu çözeltileri, bir homojenizatör (Ultra-Turrax IKA T-18 Basic, ABD) kullanılarak 10000 rpm'de 5 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Köpük kapasitesi (%), homojenizasyon öncesindeki toplam hacim (V_0) ve homojenizasyon sonrasındaki toplam hacim (V_1) kullanılarak Eşitlik 3.3 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Köpük kapasitesi (\%)} = \frac{(V_1 - V_0)}{V_0} \times 100 \quad (3.3)$$

Köpük stabilitesi ise, homojenizasyon işleminden sonra oda sıcaklığında 60 dakika bekletilen örneğin toplam hacminin (V_2) belirlenmesiyle hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4).

$$\text{Köpük stabilitesi (\%)} = \frac{(V_2 - V_0) \times 100}{(V_1 - V_0)} \quad (3.4)$$

3.3.4 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi, Pearce ve Kinsella (1978) tarafından geliştirilen ve Feyzi ve ark. (2018) tarafından modifiye edilen bulanıklık yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak, 22.5 mg örnek 15 mL'lik bir tüpe tartılmış, ardından üzerine 4.5 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) eklenmiş ve örnek

1 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Bu karışıma, çözelti hacminin 1/3'ü oranında (1.5 mL) ayçiçeği yağı eklenmiş ve 22000 rpm'de 2 dakika boyunca homojenizasyon uygulanmıştır.

Emülsiyon stabilitesini belirlemek için, homojenizasyon işleminin hemen ardından (t=0), 250 µL emülsiyon 1 g/L konsantrasyonda 50 mL sodyum dodesil sülfat ile karıştırılmış ve bu karışımın 500 nm'deki absorbans değeri kaydedilmiştir (A_0). Aynı şekilde, başlangıç emülsiyonu oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra aynı işlem uygulanmış ve 500 nm'deki absorbans değeri kaydedilmiştir (A_{15}). Emülsiyon stabilitesi (dak) Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (dak)} = \frac{A_0}{(A_0 - A_{15})} \times t \quad (3.5)$$

Emülsiyon aktivitesini hesaplamak için, t=0 anında alınan 800 µL emülsiyon, yağ hacim fraksiyonunun (Φ) belirlenmesi amacıyla 120°C'deki etüvde 2 saat boyunca kurutulmuştur. Sabit tartıma ulaşılan örnek, desikatörde bekletildikten sonra tartılmış ve içerisindeki kütleli yağ fraksiyonu hesaplanmıştır. Daha sonra, yağın özgül ağırlığı (0.918 g/mL) kullanılarak Φ değeri belirlenmiştir. Emülsiyon aktivitesi (m^2/g) Eşitlik 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (m}^2/\text{g)} = \frac{2T \times D}{\Phi \times C} = \frac{(2 \times 2.303 \times A_0 \times D)}{(\Phi \times C \times L)} \quad (3.6)$$

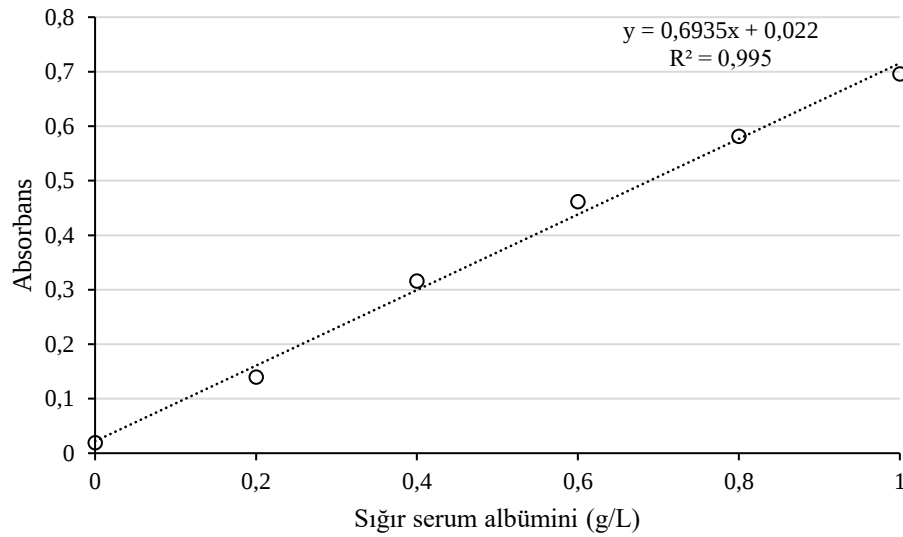
Burada, T türbidite ($T = 2.303 \times A_0/L$), D seyreltme faktörü (200), Φ emülsiyon yağ hacim fraksiyonu (g yağ/g örnek), C çözeltideki protein konsantrasyonu (0.005 g/mL), L küvet yol uzunluğudur (10^{-2} m).

Protein izolatlarının emülsiyon kapasitesi, Neto ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve Feyzi ve ark. (2018) tarafından modifiye edilen yöntemle göre belirlenmiştir. 10 mL protein izolatu çözeltisine (10 g/L) eşit hacimde ayçiçek yağı eklenmiş ve 7200 rpm'de 2 dakika homojenize edilerek emülsiyon oluşturulmuştur. Elde edilen emülsiyonlara daha sonra, 3250 rpm'de 2 dakika santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj işlemi uygulanmadan önce tüpte bulunan emülsiyonun toplam yüksekliği H_0 (cm), üst faz yüksekliği ise H_1 (cm) olarak ölçülmüş ve emülsiyon kapasitesi (%) Eşitlik 3.7 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon kapasitesi (\%)} = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (3.7)$$

3.3.5 Çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L), Feyzi ve ark. (2018) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Protein izolatı çözeltileri, saf su ile 10 g/L konsantrasyonda hazırlanmış ve pH değerleri HCl ve NaOH kullanılarak 2.0-12.0 aralığında ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılan örnekler, 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich Eba 21, Almanya). Örneklerin süpernatant fazındaki protein içeriği, Bradford metodu (Bradford, 1976) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, 0.1 mL süpernatant faz üzerine 5 mL Bradford çözeltisi eklenmiş ve karışım vorteks ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra örneklerin absorbansları 595 nm’de ölçülmüştür. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Bradford metodu için hazırlanan standart eğri Şekil 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Bradford metodunda kullanılan standart eğri

3.3.6 Moleküler ağırlığın belirlenmesi

Farklı protein izolatlarında bulunan proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi (Laemmli,

1970) kullanılmıştır. SDS-PAGE işlemi dikey elektroforezde Coomassie boyama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada %12'lik jel kullanılmış ve her örnek için 10 µg ve 50 µg örnek yüklenmiştir. Örnekler, 200 V gerilim altında 50 dakika yürütülmüş ve jel Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmıştır. ~10-180 kDa molekül ağırlığına sahip standart (Thermo Fisher PageRuler Prestained Protein Ladder) kullanılmıştır. Örneklerin molekül ağırlıkları, Thermo Fisher Gel Analyzer 19.1 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.7 Yapısal özelliklerin belirlenmesi

Farklı protein izolatlarının yapısal özellikleri, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrometresi (Perkin Elmer 400, ABD) kullanılarak belirlenmiştir (Byler ve Susi, 1986). Analizde Elmas ATR metodu kullanılmış ve 4000-400 cm^{-1} spektrum aralığında ölçümler yapılmıştır. FT-IR spektrumları, protein izolatlarının protein ikincil yapılarını belirlemek için Amid I bant bölgesi (1600-1700 cm^{-1}) dikkate alınarak incelenmiştir. Protein ikincil yapılarının yüzdelik olarak belirlenmesinde, pik merkez noktaları baz alınmış ve Peakfit v4.12 paket programı (Systat Software, ABD) yardımıyla piklerin alanları hesaplanmıştır.

3.3.8 Termal özelliklerin belirlenmesi

Farklı protein izolatlarının denatürasyon sıcaklıkları (T_d , °C) ve denatürasyon entalpileri (ΔH_d , mJ/g) Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) cihazı (Perkin Elmer DSC 8000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Analizler, azot ortamında 10 mg örnek kullanılarak 20-200°C sıcaklık aralığında ve 5°C/dakika ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi

Enzim+ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile üretilen protein izolatının (E+UDE) amino asit kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla örneğe asit hidrolizi uygulanmış ve örneklerin amino asit kompozisyonları ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) yöntemi ile ultraviyole dedektör (UV) kullanılarak (Shimadzu 20A, Japonya) tespit edilmiştir. Kompozisyon analizleri alanin, arjinin, aspartik asit, fenilalanin, glisin, glutamik asit,

histidin, izolösin, lizin, lösin, metiyonin, prolin, serin, treonin, triptofan, trozin, valin için gerçekleştirilmiştir. Triptofan miktarı tayininde ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi-flüoresans dedektör (HPLC-FLD) (Shimadzu 20A, Japonya) kullanılmıştır.

3.4 Fesleğen Tohumu Protein İzolatından Biyoaktif Peptit Üretimi

Enzim+ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen protein izolatından (E+UDE) biyoaktif peptit üretimi amacıyla enzimatik hidroliz işlemi uygulanmıştır. Enzimatik hidroliz işleminde kullanılan enzimler ilgili literatür yardımıyla seçilmiş ve tez çalışmasında alkalaz, flavourzyme ve pepsin enzimleri kullanılmıştır. Ayrıca, enzimatik hidroliz işlemi ultrasonik destekli olarak gerçekleştirilmiştir.

Fesleğen protein izolatlarına uygulanacak enzimatik hidroliz işlemi için ön deneme sonuçları ve ilgili literatür doğrultusunda bir deneysel tasarım oluşturulmuştur (Çizelge 3.2). Oluşturulan tasarımda enzim:substrat oranı (0.5-15 %), alkalaz:flavourzyme oranı 0-1 (U/U) ve hidrolizasyon süresi (60-240 dakika) bağımsız değişkenler, hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonunu bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Bu aşamada, ortam pH'sı ön denemeler ile belirlenen pH 8.0'a ayarlanmıştır. Belirlenen optimum enzimatik hidroliz koşullarında elde edilen örneklerin pH'sı 2.0'a ayarlanmış ve %5 enzim:substrat oranında 37°C'de 40 dakika pepsin uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Hidrolizasyon işlemlerinin ardından örnekler enzim inaktivasyonu için 90°C'de 10 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiş ve ardından oda sıcaklığına buzlu su kullanılarak hızlıca soğutulmuştur. Elde edilen protein hidrolizatlarının saflaştırılmasında ultrafiltrasyon tekniği kullanılmıştır. 15 mL hidrolizat, moleküler ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) 10 kDa olan ultrafiltrasyon membranlara (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Almanya) yüklenmiş ve 8000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Hidrolizat, santrifüj işlemi sonrasında molekül ağırlığı >10 kDa ve <10 kDa olmak üzere iki fraksiyona ayrılmıştır. Molekül ağırlığı <10 kDa olan fraksiyon biyoaktif peptit olarak analizlerde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Fesleğen tohumu protein izolatına uygulanan enzimatik hidroliz deneme planı

Deneme No.	Enzim:Substrat (%)	Alkalaz:Flavourzyme Oranı (U/U)	Hidroliz Süresi (dak)
1	0.50	0.0	150
2	7.75	0.5	150
3	15.00	0.0	150
4	7.75	0.5	150
5	7.75	0.0	240
6	15.00	0.5	60
7	0.50	0.5	240
8	7.75	1.0	240
9	15.00	1.0	150
10	15.00	0.5	240
11	0.50	1.0	150
12	0.50	0.5	60
13	7.75	0.0	60
14	7.75	1.0	60
15	7.75	0.5	150

3.5 Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu

Optimum koşullarda elde edilen hidrolizatlar ve molekül ağırlığı <10 kDa olan fraksiyonların (biyoaktif peptit) karakterizasyonu amacıyla hidroliz dereceleri, antioksidan aktiviteleri (DPPH, ABTS, hidroksil süpürme aktivitesi, FRAP), şelatlama aktiviteleri, anti-hipertansif aktiviteleri, anti-diyabetik aktiviteleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca, <10 kDa fraksiyonların antioksidan aktivite, şelatlama aktivitesi, anti-hipertansif aktivite ve anti-diyabetik aktivite için *in vitro* gastrointestinal sistem stabiliteleri tespit edilmiştir.

3.5.1 Hidroliz derecesinin belirlenmesi

Hidrolizasyonu gerçekleştirilen protein izolatlarının hidroliz dereceleri Qi ve ark. (1997) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. 5 mL hidrolizat 5 mL %20'lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile karıştırılarak 6000 rpm'de 25°C'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant fazda ve örnekte bulunan toplam azot Kjeldahl yöntemi ile belirlenerek hidroliz derecesi (%) Eşitlik 3.8 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hidroliz Derecesi (\%)} = \frac{\text{Süpernantant fazda bulunan azot miktarı (mg)}}{\text{Örnekte bulunan azot miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.5.2 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Fesleğen tohumu protein izolatlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitelerinin ortaya konması için DPPH inhibisyonu (%), ABTS inhibisyonu (%), hidroksil serbest radikal süpürme aktivitesi (%) kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, FRAP yöntemi ile de antioksidan aktivite belirlenmiştir.

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) inhibisyonu (%) Bersuder ve ark. (1998) tarafından bildirilen ve Bougateg ve ark. (2009) tarafından modifiye edilen yöntemle göre belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki her bir örneğin 500 µL hacmindeki bir miktarı, 500 µL etanol ve 125 µL %0.02'lik DPPH (etanolda) ile karıştırılmıştır. Karışım daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiş ve DPPH radikalinin inhibisyonu 517 nm dalga boyunda bir spektrofotometre (T80+, UV/VIS spektrofotometre, PG Instruments Ltd., Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol örneği, peptit örneği yerine yalnızca etanol içermiştir. DPPH inhibisyonu (%) Eşitlik 3.9 ile hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH İnhibisyonu (\%)} = \frac{\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örnek absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (3.9)$$

ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit]) inhibisyonu (%) Re ve ark. (1999) ve Xue ve ark. (2015) tarafından bildirilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla, 7 mM ABTS stok çözeltisi ve 2.45 mM K₂S₂O₈ hazırlanarak eşit oranda karıştırılmış ve 16 saat süre ile karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hazırlanan çözeltiden 1 ml alınarak 54 ml tampon çözelti (20 mM sodyum asetat, pH 4.5) içerisinde seyreltilmiştir. ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisinin 734 nm dalga boyunda okuma değeri 0.700±0.02 olarak elde edilmiştir. 2 mL ABTS stok çözeltisi 25 µL peptit çözeltisi ile 6 dakika boyunca karıştırılmış ve absorbans değeri 734 nm'de ölçülmüştür. Kontrol örneği, peptit örneği yerine yalnızca tampon çözeltisi içermiştir. ABTS inhibisyonu (%) Eşitlik 3.10 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{ABTS İnhibisyonu (\%)} = \frac{\text{Kontrol absorbansı}-\text{Örnek absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (3.10)$$

Örneklerin hidroksil serbest radikal süpürme aktiviteleri Yao ve ark. (2021) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. Bu amaçla, dört farklı çözelti ($A_{k\ddot{o}r}$, A_0 , A_x ve A_{x0}) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin bileşimi Çizelge 3.3'te verilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutulmuştur. Ardından $A_{k\ddot{o}r}$ örneği ile sıfırlama yapılarak 510 nm'de örneklerin absorbans değerleri okunmuştur. Örneklerin hidroksil serbest radikal süpürme aktiviteleri Eşitlik 3.11 ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. Hidroksil süpürme aktivitesi için hazırlanan çözeltiler

Reaktif	A_x (mL)	A_{x0} (mL)	A_0 (mL)	$A_{k\ddot{o}r}$ (mL)
9 mmol/L FeSO ₄	1	1	1	1
9 mmol/L salisilik asit-etanol	1	1	1	1
Biyoaktif peptit çözeltisi	6	6	-	-
Hidrojen peroksit	1	-	1	-
Saf su	-	1	6	7

$$\text{Hidroksil Süpürme Aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100 \quad (3.11)$$

IC₅₀ değerleri, farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin % inhibisyon değerlerinin tespit edilmesi ve grafiğe geçirilmesi sonucunda elde edilen doğrusal eşitlikten %50 inhibisyonu sağlayan örnek konsantrasyonunun belirlenmesi ile hesaplanmıştır.

Örneklerin antioksidan aktiviteleri ayrıca Benzie ve Strain (1996) tarafından bildirilen ve Chen ve ark. (2019) tarafından modifiye edilen FRAP yöntemi ile tespit edilmiş ve antioksidan aktivite µg Trolox/mL cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.3 Şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

Biyoaktif peptit örneklerinin metal şelatlama aktiviteleri Boyer ve McCleary (1987) tarafından bildirilen ve modifiye edilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. 940 µL örnek 20

μL FeCl_2 (2 mM) ve 40 μL 5 mM ferrozin çözeltisi ile karıştırılmıştır. Kontrol için örnek yerine saf su kullanılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm'de absorbansları okunmuştur. Örneklerin şelatlama aktiviteleri Eşitlik 3.12 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Şelatlama aktivitesi (\%)} = [(B_{562} - A_{562}) / B_{562}] \times 100 \quad (3.12)$$

Burada, B_{562} kontrol örneğin 562 nm'deki absorbans değerini, A_{562} örneklerin 562 nm'deki absorbans değerini ifade etmektedir. IC_{50} değerleri, farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin % şelatlama değerlerinin tespit edilmesi ve grafiğe geçirilmesi ile %50 şelatlamayı sağlayan örnek konsantrasyonu olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.5.4 Anti-hipertansif aktivitenin belirlenmesi

Örneklerin anti-hipertansif özellikleri Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ACE inhibisyon aktivitesi Hayakari ve ark. (1978) tarafından bildirilen ve Chang ve ark. (2001) tarafından modifiye edilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ve 0.3 M NaCl (HCl ile pH 8.3'e ayarlı) içeren Tampon A ve 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ve 0.2 M NaOH (NaOH ile pH 12.0'a ayarlı) içeren Tampon B çözeltileri hazırlanmıştır. Orto-ftalaldehit (1.5 mL, 10 mg/mL etanolde) ve 2-merkaptometanol çözeltisinin (1.5 mL, 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ etanolde) 100 mL Tampon B ile karıştırılmasıyla OPA ayırıcı hazırlanmıştır (o-ftalaldehit ve 2-merkaptometanol çözeltilerinin yaklaşık konsantrasyonu 1 mM olmuştur). ACE çözeltisi ise Tampon A'da 40 mU/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hippuril-histidil-lösin (HHL) çözeltisi ise Tampon A'da 15 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasının ardından ACE inhibisyon aktivitesi, A_1 , A_2 , A_3 ve A_4 absorbans değerlerinin 390 nm'de tespit edilmesi ile hesaplanmıştır. A_1 için 100 μL örnek, 100 μL ACE çözeltisi ve 100 μL HHL çözeltisi, A_2 için 100 μL örnek ve 200 μL Tampon A, A_3 için 100 μL Tampon A, 100 μL ACE çözeltisi ve 100 μL HHL çözeltisi karıştırılmış, A_4 için ise yalnızca 300 μL Tampon A kullanılmıştır. Tüm çözeltiler 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde 3 mL OPA ayırıcı kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. ACE inhibisyonu Eşitlik 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{ACE İnhibisyonu (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100 \quad (3.13)$$

ACE inhibisyonuna karşılık peptit konsantrasyonu (mg/mL) ile oluşturulan grafiğin doğrusal regresyon analizinden IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.5.5 Anti-diyabetik aktivitenin belirlenmesi

Örneklerin anti-diyabetik aktiviteleri, α -amilaz inhibisyonu ve α -glukosidaz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. α -amilaz inhibisyonu, Vilcacundo ve ark. (2017) tarafından bildirilen ve González-Montoya ve ark. (2018) tarafından modifiye edilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. 50 μ L örnek (pozitif kontrol olarak akarboz, negatif kontrol olarak saf su) 100 μ L α -amilaz çözeltisi (2 U/mL, 0.02 M sodyum fosfat tampon pH 6.9) ile karıştırılmıştır. 20°C'de 5 dakikalık ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ortama 100 μ L %1'lik nişasta çözeltisi eklenmiş ve örnekler çalkalamalı su banyosunda 20°C'de 6 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 100 μ L DNS (3,5 dinitrosalisilik asit) çözeltisi eklenmiş ve örnekler 100°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Karışıma 800 μ L saf su eklenerek 540 nm'de örneğin absorbansı okunmuştur. α -amilaz inhibisyon aktivitesi, %100 enzim aktivitesine sahip negatif kontrole oranlanarak belirlenmiştir. IC₅₀ değeri (α -amilaz aktivitesini %50 oranında inhibe eden örnek konsantrasyonu) α -amilaz inhibisyon (%) grafiği kullanılarak tespit edilmiştir.

α -glukosidaz inhibisyonu, Vilcacundo ve ark. (2017) tarafından bildirilen ve González-Montoya ve ark. (2018) tarafından modifiye edilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. 100 μ L örnek (pozitif kontrol olarak akarboz, negatif kontrol olarak saf su), 50 μ L α -glukosidaz (1 U/mL, 0.02 M sodyum fosfat tampon pH 6.9) ile karıştırılmıştır. 37°C'de 5 dakika süre ile ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ortama 50 μ L maltoz (2 mM) eklenmiş ve örnekler çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmış ve elde edilen süpernatantlarda bulunan glukoz konsantrasyonu DNS ile tespit edilmiştir. α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi, %100 enzim aktivitesine sahip negatif kontrole oranlanarak belirlenmiştir. Biyoaktif peptit için IC₅₀ değeri (α -glukosidaz aktivitesini %50 oranında inhibe eden örnek konsantrasyonu) α -glukosidaz inhibisyon (%) grafiği kullanılarak tespit edilmiştir.

3.5.6 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için Segura-Campos ve ark. (2013) tarafından bildirilen kağıt disk difüzyon agar metodu kullanılmıştır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan beş farklı patojen mikroorganizma (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes*) seçilmiştir.

3.5.7 Gastrointestinal sistem stabilitesinin belirlenmesi

Biyoaktif peptitlerin *in vitro* gastrointestinal sistem stabilitelerinin belirlenmesi için ağız, mide ve bağırsak sıvıları, α -amilaz, pepsin, safra ve pankreatin enzimleri kullanılarak hazırlanmıştır. Gastrointestinal sistem stabilitenin *in vitro* olarak belirlenmesi için kullanılan kimyasallar ve her bir bölge (ağız, mide ve bağırsak) için oluşturulacak olan çözeltilerin miktarları Minekus ve ark. (2014) tarafından bildirilen yöntemle göre hazırlanmıştır. *In vitro* gastrointestinal sistem stabilitesi analizlerinde ağız basamağı için 0.2 mL biyoaktif peptit örneği üzerine 3.5 mL ağız sıvısı, 0.5 mL α -amilaz, 25 μ L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 975 μ L saf su eklenmiştir. Elde edilen karışımın pH değeri 0.3 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile pH 7.0'a ayarlanmıştır. Numune insan vücut sıcaklığı olan 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 dakika süre ile inkübe edilmiş ve analizler için 2 mL örnek ayrılmıştır. Kalan örnekle mide aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada ağız aşamasından gelen örnek üzerine 6 mL mide sıvısı, 1.28 mL pepsin, 4 μ L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.16 mL HCl ve 0.556 μ L saf su eklenmiştir. Karışımın pH değeri mide pH değeri olan 3.0'a ayarlanmıştır. Örnek sonrasında 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 2 dakika süre ile inkübe edilmiş ve analizler için 2 mL örnek ayrılarak bağırsak aşamasına geçilmiştir. Bağırsak aşamasında örnek üzerine 7.7 mL bağırsak sıvısı, 3.5 mL pankreatin, 1.75 mL safra, 28 μ L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.105 mL NaOH ve 0.917 μ L saf su eklenmiştir. Karışım pH değeri NaOH ile 7.0'a ayarlanmıştır. Örnekler 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübe edilmiştir. Ağız, mide ve bağırsak aşamalarının her birinden alınan örneklerin antioksidan aktivite, anti-hipertansif aktivite ve anti-diyabetik aktiviteleri belirlenmiştir.

3.6 İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon

İstatistiksel analizler, SPSS 21.0 (SPSS Inc., ABD) ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak yapılmıştır. Deneyssel verilerle tahmin edilen değerler arasındaki farkı belirlemek için tek örnek t-testi ve örneklerin karşılaştırılmasında ‘Univariate Varyans Analizi, Duncan post hoc’ testi SPSS 21.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. İşlem değişkenlerinin etkilerini belirlemek için uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon işlemleri Design Expert 7.0 (Stat-Ease, Inc., ABD) paket programı ile yapılmıştır.

Fesleğen tohumundan protein ekstraksiyonu için yapılan ön denemeler doğrultusunda 29 noktalı ve 4 faktörlü Box-Behnken deneme planı oluşturulmuştur. Fesleğen tohumundan proteinlerin ekstraksiyonunda enzimatik ön işlem için yanıt olarak protein verimi ve indirgen şeker içeriği seçilmiştir. İstenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile en yüksek protein verimi ve indirgen şeker içeriğini sağlayan koşullar tespit edilmiştir. Enzimatik ön işlem yanıtları için oluşturulan modeller Eşitlik 3.14 ile gösterilmiştir.

$$\begin{array}{l} \text{Protein Verimi (\%)} \\ \text{İndirgen Şeker (mg glukoz/g tohum)} \end{array} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} \quad (3.14)$$

$k=1, 2, 3, 4$

Ön denemeler dikkate alınarak fesleğen tohumu protein izolatı enzimatik hidrolizi için 15 noktalı ve 3 faktörlü Box Behnken deneme planı oluşturulmuştur. Fesleğen tohumu protein izolatına uygulanan enzimatik hidroliz işlemi için hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu (%) yanıt olarak seçilmiş, istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile en yüksek hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonunu sağlayan koşullar belirlenmiştir. Regresyon analizi için kullanılan modeller hidroliz derecesi için Eşitlik 3.15 ile verilmiştir.

$$\begin{array}{l} \text{Hidroliz Derecesi (\%)} \\ \text{DPPH İnhibisyonu (\%)} \end{array} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} \quad (3.15)$$

$k=1, 2, 3$

Eşitliklerde, β_0 sabit katsayıyı, β_i i'inci gözlemin katsayısını, β_{ij} i'inci gözlemin j'inci katsayısını, k bağımsız değişken sayısını, X_i i'inci bağımsız değişkeni, X_{ij} ise i'inci gözlemin j'inci bağımsız değişkenini ifade etmektedir.

İşlem değişkenlerinin yanıt üzerindeki etkileri, elde edilen sonuçlara göre varyans analizi (ANOVA) tablosu kullanılarak değerlendirilmiştir. Varyans analizleri Design Expert Version 7.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her bir bağımsız değişkenin yanıt üzerindeki lineer, etkileşim ve kuadratik etkilerinin istatistiksel önemliliği belirlenmiştir. Etkilerin model açısından istatistiksel önemi ' p ' değeri ile değerlendirilmiştir. Deneysel tasarımların merkez noktalarında yapılan tekrarlarla kalıntı hata değerleri, saf deneysel hata ve model uygunsuzluğu olarak ayrılarak ANOVA çizelgesinde gösterilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda üç adet deneme ile doğrulama testleri yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Fesleğen Tohumundan Protein Ekstraksiyonu

Fesleğen tohumunda bulunan proteinler için enzimatik ön işlem sonrası klasik ekstraksiyona ait deneme planı, elde edilen protein verimi ve indirgen şeker miktarı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek protein verimi (85.89 ± 0.77) ve en yüksek indirgen şeker (153.01 ± 1.27 mg/g) miktarı pH’nın 3.0, sıcaklığın 45°C , enzim miktarının 5 FBGU/g tohum ve sürenin 3 saat olduğu koşullarda elde edilmiştir. En düşük protein verimi (48.68 ± 0.53) ve en düşük indirgen şeker miktarı (48.52 ± 1.20 mg/g) ise pH’nın 4.0, sıcaklığın 35°C , enzim miktarının 2.75 FBGU/g tohum ve sürenin 1 saat olduğu koşullarda belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Sonuçlara göre, indirgen şeker miktarı ile protein veriminin paralellik gösterdiği, indirgen şeker miktarının arttığı koşullarda protein veriminin de arttığı gözlemlenmiştir. Aynı sıcaklık, süre ve enzim miktarı koşullarında, pH 4.0 ve 5.0’a kıyasla pH 3.0’da hem protein veriminin hem de indirgen şeker miktarının belirgin şekilde arttığı, azalan pH’nın bu değerlerde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı enzim miktarı ve süre koşulları altında tüm pH’larda sıcaklık artışı ile protein verimi ve indirgen şeker miktarında artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, aynı sıcaklık ve süre koşullarında, pH 3.0 ve 4.0 için enzim miktarındaki artışın protein verimi ve indirgen şeker miktarını artırdığı belirlenmiştir. Tüm pH değerlerinde, aynı sıcaklık ve enzim miktarları için süre artışı ile protein verimi ve indirgen şeker miktarının artış gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.1). Literatürde enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon işlem koşullarının protein ekstraksiyonuna etkisini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Rodrigues ve ark. (2014) kolza tohumu posası protein izolatu üretiminde yüksek verim elde edebilmek için enzimatik karbonhidrazları (Pectinex® Ultra SP-L, Celluclast® 1.5L ve Viscozyme® L) kullanmışlardır. En yüksek karbonhidrat parçalanma veriminin (80) Viscozyme® L ile sağlandığı bildirilmiş, optimum koşullar olarak pH 3.5, 45°C , 24 saat ve 19.2 FBGU/g yağsız tohum olarak tespit edilmiştir (Rodrigues ve ark., 2014). Zhang ve ark. (2009) pamuk tohumu protein izolatının alkali ekstraksiyonunda sıcaklığın artmasıyla birlikte protein ekstraksiyon hızının da arttığını, katı ve sıvı arasındaki ara fazda kütle aktarım hızının geliştiğini ve bu nedenle sıcaklığın arttırılması ile kütle aktarım hızı ve çözünürlüğün arttırabileceğini, dolayısıyla ekstraksiyon hızının arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan diğer çalışmalarda, enzimatik ön işlemin susam kepeği, yulaf kepeği ve yağsız soya unu gibi bitkisel materyallerden protein ekstraksiyonunda klasik ekstraksiyona göre verimi artırdığı gösterilmiştir (Guan ve Yao, 2008; Rosset ve ark., 2014; Görgüç ve ark., 2019). Gerçekleştirilen tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürden derlenen enzimatik ön işlemlili klasik ekstraksiyon çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmüştür (Zhang ve ark., 2007; Rodrigues ve ark., 2014; Görgüç ve ark., 2019; Turker ve Isleroglu, 2024).

Çizelge 4.1. Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon işlemi ile protein ekstraksiyonu

Deneme No.	pH	Sıcaklık (°C)	Enzim Miktarı (FBGU/g tohum)	Süre (saat)	Protein Verimi (%)	İndirgen Şeker (mg glukoz/g tohum)
1	4.0	45	2.75	3	72.06 (±0.41)	97.75 (±0.51)
2	5.0	45	2.75	1	53.98 (±0.86)	82.81 (±1.53)
3	5.0	35	2.75	3	52.18 (±1.17)	52.68 (±0.76)
4	3.0	45	0.50	3	64.30 (±1.02)	73.82 (±0.92)
5	4.0	45	2.75	3	73.16 (±0.23)	101.23 (±1.45)
6	5.0	45	0.50	3	62.50 (±0.73)	71.27 (±1.35)
7	4.0	45	5.00	5	79.50 (±0.85)	136.54 (±3.71)
8	5.0	45	5.00	3	68.68 (±1.16)	92.58 (±0.82)
9	4.0	45	0.50	5	71.98 (±1.24)	96.65 (±0.89)
10	4.0	35	2.75	1	48.68 (±0.53)	48.52 (±1.20)
11	4.0	45	5.00	1	69.96 (±0.60)	98.18 (±1.31)
12	4.0	45	0.50	1	59.33 (±1.84)	65.58 (±0.53)
13	4.0	55	5.00	3	81.36 (±1.41)	138.75 (±1.35)
14	3.0	55	2.75	3	82.65 (±1.69)	152.41 (±1.64)
15	4.0	55	2.75	1	66.89 (±1.15)	90.37 (±1.42)
16	5.0	55	2.75	3	73.24 (±0.43)	101.15 (±0.39)
17	5.0	45	2.75	5	64.02 (±0.44)	63.55 (±1.15)
18	4.0	35	5.00	3	60.08 (±0.25)	83.92 (±1.06)
19	4.0	55	0.50	3	69.18 (±0.18)	96.90 (±0.89)
20	4.0	35	2.75	5	59.58 (±1.96)	82.73 (±1.53)
21	4.0	55	2.75	5	76.53 (±0.29)	123.56 (±2.04)
22	3.0	45	2.75	5	77.53 (±0.55)	142.14 (±2.20)
23	4.0	45	2.75	3	74.14 (±1.55)	106.16 (±2.26)
24	3.0	45	2.75	1	65.45 (±0.86)	76.02 (±0.64)
25	3.0	35	2.75	3	56.87 (±1.18)	72.20 (±2.37)
26	4.0	45	2.75	3	72.36 (±0.72)	99.20 (±0.78)
27	4.0	35	0.50	3	51.18 (±0.93)	51.07 (±1.06)
28	4.0	45	2.75	3	75.12 (±0.99)	105.39 (±1.02)
29	3.0	45	5.00	3	85.89 (±0.77)	153.01 (±1.27)

Fesleğen tohumundaki proteinlerin enzimatik ön işlem uygulanmış klasik ekstraksiyonunun optimizasyonu için protein verimi ve indirgen şeker miktarı bağımlı değişkenler olarak seçilmiş ve ikinci dereceden polinomiyal bir model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelin istatistiksel anlamlılığı varyans analizi (ANOVA)

kullanılarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.2’de verilen ANOVA tablosuna göre oluşturulan model istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), model uygunsuzluğu ise istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$). pH, enzim miktarı, sıcaklık ve sürenin protein verimi ve indirgen şeker miktarı üstündeki lineer etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca, sıcaklık ve sürenin protein verimi ve indirgen şeker miktarı üstündeki kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), buna karşın enzim miktarının anlamsız olduğu ($p>0.05$) belirlenmiştir. pH’nın indirgen şeker miktarı üstündeki kuadratik etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). pH’nın protein verimi üstündeki kuadratik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (izelge 4.2). Sıcaklık ve süre, enzim miktarı ve süre interaksiyonlarının protein verimi ve indirgen şeker miktarı üstündeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Buna karşın, pH ve enzim miktarı interaksiyonunun protein verimi ve indirgen şeker miktarına etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). pH ve sre ile pH ve sıcaklık interaksiyonlarının protein verimine etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). pH ve sre ile pH ve sıcaklık interaksiyonlarının indirgen şeker miktarına etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (izelge 4.2).

Çizelge 4.2. Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonu işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı		F Değeri		p - Değeri	
		Protein Verimi	İndirgen Şeker Miktarı	Protein Verimi	İndirgen Şeker Miktarı	Protein Verimi	İndirgen Şeker Miktarı
Model	14	2518.95	23097.64	39.00	34.60	< 0.0001	< 0.0001
X ₁	1	228.20	3521.66	49.46	73.86	< 0.0001	< 0.0001
X ₂	1	1225.69	8112.41	265.67	170.14	< 0.0001	< 0.0001
X ₃	1	374.40	5111.75	81.15	107.21	< 0.0001	< 0.0001
X ₄	1	291.11	2811.34	63.10	58.96	< 0.0001	< 0.0001
X ₁ X ₂	1	5.54	251.92	1.20	5.28	0.2915	0.0374
X ₁ X ₃	1	59.40	837.70	12.88	17.57	0.0030	0.0009
X ₁ X ₄	1	15.25	1822.70	3.31	38.23	0.0905	< 0.0001
X ₂ X ₃	1	2.67	20.24	0.58	0.42	0.4592	0.5253
X ₂ X ₄	1	0.40	0.26	0.087	5.50x10 ³	0.7729	0.9423
X ₃ X ₄	1	2.42	13.32	0.52	0.28	0.4810	0.6054
X ₁ ²	1	26.58	53.33	5.76	1.12	0.0309	0.3081
X ₂ ²	1	261.72	393.66	56.73	8.26	< 0.0001	0.0123
X ₃ ²	1	2.86	0.28	0.62	5.96x10 ³	0.4443	0.9395
X ₄ ²	1	91.52	252.67	19.84	5.30	0.0005	0.0372
Kalıntı	14	64.59	667.52				
Model	10	58.16	612.27	3.62	4.43	0.1133	0.0821
Uygunsuzluğu							
Saf Hata	4	6.43	55.25				
Toplam	28	2583.53	23765.16				
		R ²	düz-R ²	Yeterli Tahminleme		PRESS	C.V. (%)
Protein Verimi		0.9750	0.9500	23.67		345.06	3.16
İndirgen Şeker		0.9719	0.9438	21.18		3613	7.27

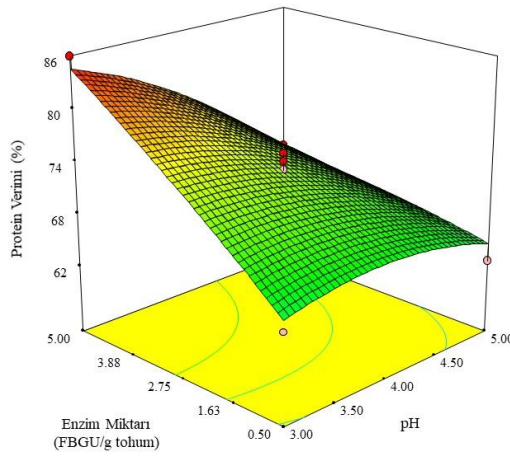
X₁: pH, X₂: sıcaklık (°C), X₃: Enzim miktarı (FBGU/g tohum), X₄: Süre (saat) SD: Serbestlik derecesi, PRESS: Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı, C.V.: Varyasyon Katsayısı

Protein verimi ve indirgen şeker miktarı için oluşturulan eşitlikler sırası ile Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2 ile verilmiştir. R² ve düzeltilmiş R² (düz-R²) değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu değerler modelin istatistiksel olarak önemsiz terimlerden oluşmadığını göstermektedir. İstatistiksel veriler (yeterli tahminleme, PRESS, C.V.) ile modelin uygunluğu tekrar doğrulanmıştır.

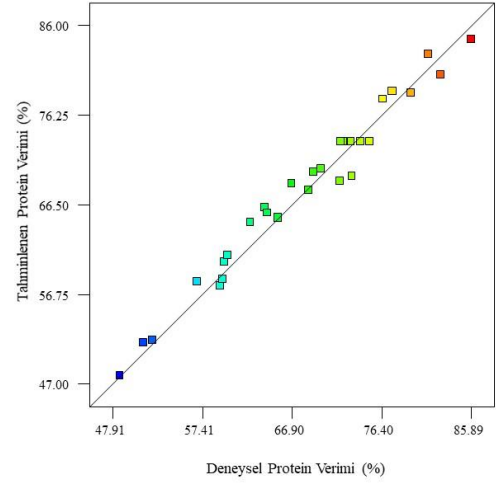
$$\begin{aligned} \text{Protein verimi} &= 190.1 + 24.8X_1 + 7.1X_2 + 8.9X_3 + 13.2X_4 - 1.0X_1X_3 - 2.0X_1^2 - 0.06X_2^2 - 0.94X_4^2 \\ (\%) & \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \text{İndirgen şeker} &= 539.8 + 91.2X_1 + 12.5X_2 + 13.6X_3 + 30.0X_4 - 0.79X_1X_2 - 6.4X_1X_3 - 10.7X_1X_4 \\ (\text{mg glukoz/g} & \quad - 0.08X_2^2 - 1.6X_4^2 \\ \text{tohum}) & \end{aligned} \quad (4.2)$$

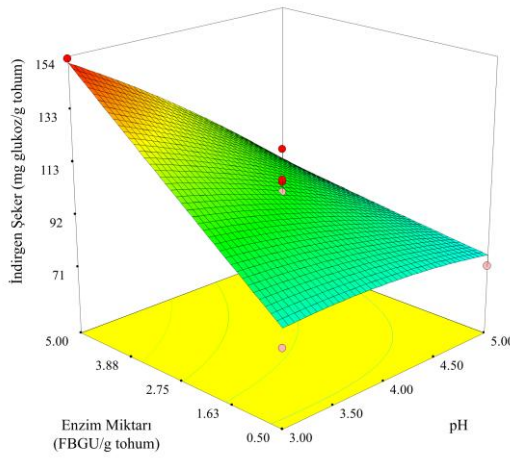
Şekil 4.1’de yanıt yüzey grafikleri ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki gösterilmiştir. Oluşturulan modelin uygunluğu, tahminlenen ve deneysel değerlerin birbirine olan yakınlığıyla doğrulanmıştır.



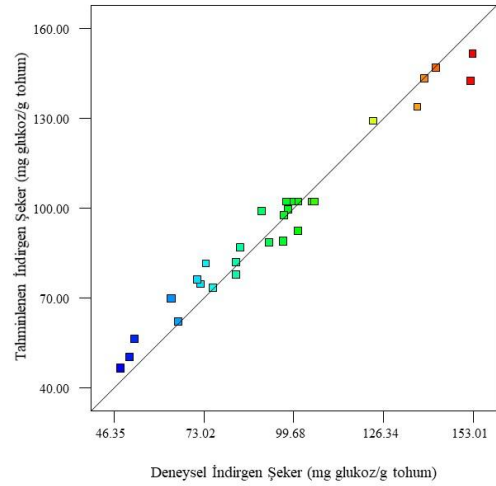
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.1. Yanıt yüzey grafikleri ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki (45°C sıcaklık ve 3 saat için): (a)-(b) protein verimi, (c)-(d) indirgen şeker

En yüksek protein verimi ve indirgen şeker miktarının elde edildiği optimum koşullar pH 3.01, sıcaklık 52.11°C, enzim miktarı 3.75 FBGU/g tohum ve süre 3.70 saat olarak tespit edilmiştir (istenebilirlik = 1.00). Bu koşullarda, protein verimi %86.55, indirgen şeker miktarı ise 164.63 mg glukoz/g tohum olarak tahminlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar için üç tekrarlı olacak şekilde doğrulama testleri gerçekleştirilmiştir. Doğrulama testlerinde protein verimi 86.20 ± 1.47 ve indirgen şeker miktarı 162.17 ± 4.73 mg glukoz/g tohum olarak tespit edilmiş ve deneysel verilerin istatistiksel olarak tahminlenen değerlerden farklı olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).

Enzimatik ön işlem uygulanmamış ve klasik alkali ekstraksiyon ile (pH 9.0, 1 saat) elde edilen kontrol örneği için, Eşitlik 3.1 ile hesaplanan, protein ekstraksiyon verimi 34.08 ± 0.57 olarak belirlenmiştir. Optimum enzimatik ön işlem koşullarında UDE işlemi (pH 9.0, %60 genlik, 10 dakika) kullanılarak üretilen E+UDE örneğinde ise protein verimi 90.12 ± 0.11 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, protein ekstraksiyonunda enzimatik ön işlemin protein verimini belirgin olarak artırdığını göstermektedir. Benzer şekilde Guan ve Yao (2008) Viscozyme® L kullanarak enzimatik ön işlem uyguladıkları yulaf kepeğinde %56'lık bir protein verimine ulaşmışlar, enzimatik ön işlem uygulanmayan örnek için protein veriminin %15 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimatik ön işlemin hücre duvarı yapısını parçalamada etkili olan karbonhidrazların kullanılmasıyla protein ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Hücre duvarının yapısal bütünlüğünün bozularak proteinlerin serbest hale geçmesi ekstraksiyon verimliliğinin artmasını sağlamaktadır (Guan ve Yao, 2008; Görgüç ve ark., 2019). Ayrıca, UDE işleminin protein verimini bir miktar artırdığı ve aynı zamanda ekstraksiyon süresini önemli ölçüde kısalttığı gözlemlenmiştir. Klasik alkali ekstraksiyon yönteminde 1 saat süren işlem, UDE ile 10 dakika içinde tamamlanmıştır. UDE işleminde ultrasonik dalgaların oluşturduğu mekanik etki ile proteinlerin daha kısa sürede ortama geçerek ekstraksiyon veriminde iyileşme sağlandığı düşünülmektedir. Bu durum, UDE'nin enerji ve zaman tasarrufu sağlayan verimli bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Görgüç ve ark., 2019; Badjona ve ark., 2024).

4.2 Fesleğen Tohumu Protein İzolatının Karakterizasyonu

4.2.1 Koagüle protein yüzdesi

Koagüle protein yüzdesi 100°C sıcaklıkta 15 dakika süre uygulanan işlem sonrası pıhtılaşan çözünür haldeki proteinlerin yüzdesi olarak ifade edilmektedir (Kramer ve Kwee, 1977). Koagüle protein yüzdeleri kontrol örneklerinin ~%3.9, E+KE örneklerinin ~%5.4, E+UDE örneklerinin ise ~%7.0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Koagüle protein yüzdesinin önemli oranda artışına sebep olan faktörün UDE işlemi olduğu düşünülmektedir. Literatürde farklı yöntemlerle elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Feyzi ve ark. (2015) klasik

ekstraksiyonla elde ettikleri çemen otu tohumunun koagüle protein yüzdesini %3.17 olarak belirlemişlerdir. Isleroglu ve Olgun (2024) çemen otu tohumundan klasik ekstraksiyonla elde ettikleri protein izolatının koagüle protein yüzdesini %3.01-4.96 aralığında belirlemişlerdir. Turker ve ark. (2024) ise UDE ile elde ettikleri çemen otu tohumu protein izolatının koagüle protein yüzdesini %15.82-31.17 olarak belirlemişlerdir. Çalışmalar kıyaslandığında, UDE işleminin koagüle protein yüzdesini arttırdığı gözlenmiştir. Sonikasyon işleminin proteinlerin yapısında meydana getirebileceği minör değişikliklerin koagüle protein yüzdesini geliştirebileceği bildirilmiştir (Akdeniz ve Akalın, 2019). Koagüle protein yüzdesi için benzer durum tez çalışmasında da gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

4.2.2 Köpük özellikleri

Köpük kapasitesi, köpürtme işlemi sırasında proteinlerin hava-sıvı arayüzeyine hızla adsorbe olması sonucunda moleküler etkileşimler yoluyla kohezif viskoelastik bir film oluşturma yeteneğinin bir göstergesidir (Mine, 1995). Köpük kapasitesi, örnekte homojenizasyon işleminin hemen sonrasında elde edilen köpük hacminin toplam örnek hacmine oranının yüzde ifadesi olarak tanımlanır. Köpük stabilitesi ise homojenizasyon sonrası belirli bir süre geçtikten sonra köpük hacminin toplam örnek hacmine oranının yüzde ifadesidir (Figuerola-González ve ark., 2022). Tez çalışmasında, E+KE ve E+UDE protein izolatlarının köpük kapasitelerinin kontrol örneklerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.3). İstatistiksel olarak E+KE örneği ile fark bulunmasa da E+UDE örneği en yüksek köpük kapasitesine sahip olmuştur (%71) (Çizelge 4.3). Benzer şekilde, E+UDE örneğinin E+KE ve kontrol örneğine göre en yüksek köpük stabilitesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.3). Buna karşın, en düşük köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi değerleri kontrol örneği için tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.3). Turker ve Isleroglu (2024) tere tohumundan tez çalışmasında kullanılan yönteme benzer şekilde elde ettikleri protein izolatlarının köpük kapasitesi değerlerini kontrol örneği için %37, E+KE örnekleri için %45, E+UDE örnekleri için %47 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, örneklerin köpük stabilitesi sırasıyla ~%54, %56 ve %62 olarak tespit edilmiştir. Tez çalışmasındaki bulgulara benzer şekilde hem köpük kapasitesi hem de köpük stabilitesi açısından en yüksek değerlerin E+UDE örneklerinde gözlemlendiği bildirilmiştir (Turker ve Isleroglu, 2024). E+UDE

örneklerinin diğerlerine göre daha yüksek köpük özelliklerine sahip olmasının nedeni, ultrasonikasyonun proteinlerdeki hidrofobik grupları açığa çıkarması ve protein yapısında kısmi denatürasyona yol açması olarak açıklanabilir (Wang ve ark., 2020). Wang ve ark. (2020) klasik ekstraksiyon işlemiyle elde ettikleri bezelye protein izolatının köpük stabilitesini %77, UDE işlemi ile elde ettikleri bezelye protein izolatlarının köpük stabilitesini ise %95 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada klasik ekstraksiyon işlemiyle elde edilen bezelye protein izolatının köpük kapasitesi %69, UDE işlemi ile elde edilen bezelye protein izolatlarının köpük kapasitesi ise %82 olarak belirlenmiş, köpük özellikleri için UDE işleminin üstünlüğü ortaya konmuştur. Isleroglu ve Olgun (2024) klasik ekstraksiyon işlemi ile elde ettikleri çemen otu protein izolatlarının köpük stabilitesinin %51.92-69.67 ve köpük kapasitesinin %10.67-18.00 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Turker ve ark. (2024) ise UDE işlemi ile elde ettikleri çemen otu protein izolatlarının köpük stabilitesinin %59.68-78.06 ve köpük kapasitesinin %16.33-21.67 aralığında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı tohumdan elde edilen protein izolatları için elde edilen sonuçlar, uygulanan UDE işleminin köpük özelliklerine olumlu etkisini ortaya koymuştur.

Liu ve ark. (2023) alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme işlemiyle elde ettikleri kenevir tohumu protein izolatının köpük stabilitesinin %80-85 aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Ek olarak, Jung ve ark. (2006) enzim destekli soya proteini ekstraksiyonunda, pektinaz ile ön işleme tabi tutularak elde edilen soya proteinlerinin köpük kapasitesinin kontrol örneklerinden farklı olmadığını, ancak köpük stabilitesinin enzimatik ön işleme önemli oranda artırıldığını bildirmişlerdir. Perović ve ark. (2022) nohut protein izolatı eldesi için klasik ekstraksiyon ve enzimatik ön işlemlili klasik ekstraksiyonu karşılaştırmışlar, enzimatik ön işlem uygulanan protein izolatlarının köpük kapasitesinin %24, köpük stabilitesinin ise %150 oranında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun uygulanan enzimatik ön işlemin yüzey aktiflik özelliklerinde değişikliklere sebep olması sonucunda ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Liu ve ark., 2018; Perović ve ark., 2022).

Çizelge 4.3. Fesleğen tohumu protein izolatlarının koagüle protein yüzdeleri ve köpük özellikleri

Örnek	Koagüle Protein (%)	Köpük Kapasitesi (%)	Köpük Stabilitesi (%)
K	3.87 (± 0.24) ^c	63.00 (± 1.41) ^b	55.54 (± 1.00) ^b
E+KE	5.35 (± 0.16) ^b	69.00 (± 1.41) ^a	56.51 (± 0.89) ^{ab}
E+UDE	7.04 (± 0.16) ^a	71.00 (± 1.41) ^a	59.17 (± 1.18) ^a

^{a-c}Aynı sütunda verilen farklı harfe sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

4.2.3 Su ve yağ tutma kapasitesi

Su tutma kapasitesi bir protein izolatının gramı başına emilebilecek toplam su miktarının ölçüsüdür (Boye ve ark., 2010; Shevkani ve ark., 2015). Proteinlerin su tutma kapasitesi hazır çorbalar, şekerlemeler, makarna, hamur ve unlu mamuller gibi ürünler için kritik bir fonksiyonel özelliktir. Bu tür ürünlerde, proteinlerin çözünürlük özelliklerinden bağımsız olarak suyu absorbe etmeleri ve istenilen viskozite düzeyine ulaşmaları gerekmektedir (Turker ve Isleroglu, 2024). En düşük su tutma kapasitesi kontrol örneğinde belirlenmiş, E+KE ve E+UDE örneklerinin su tutma kapasitelerinin ise >5 g/g olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). En yüksek su tutma kapasitesi E+UDE örneklerinde elde edilmiş, ancak E+KE örnekleri ile istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.4). UDE işlemi protein izolatlarının işlevsel özelliklerinde önemli iyileşmelere yol açabilmektedir. Bu iyileşmeler arasında artan çözünürlük, su/yağ tutma kapasitesi, köpürme/emülsiyon kapasitesi, stabilite ve jel oluşturma kapasitesi yer almaktadır (Wang ve ark., 2020). Literatürde bazı bitkisel protein izolatlarının su tutma kapasitelerinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur. Rashid ve Gülseren (2024) klasik ekstraksiyon işlemiyle elde ettiği fesleğen tohumu protein izolatının su tutma kapasitesini 2.45 g/g olarak belirlemiştir. Liu ve ark. (2022b) klasik ekstraksiyon işlemiyle elde ettikleri kenevir tohumu protein izolatının su tutma kapasitesinin 0.83-1.05 g/g aralığında değiştiğini belirlemiştir. Isleroglu ve Olgun (2024) klasik ekstraksiyon işlemi ile elde ettikleri çemen otu tohumu protein izolatının su tutma kapasitesini 2.64 g/g, Turker ve ark. (2024) UDE işlemi ile elde ettikleri çemen otu tohumu protein izolatının su tutma kapasitesini 2.68 g/g olarak belirlemiştir. Turker ve Isleroglu (2024) kontrol örneği ve E+KE ve E+UDE işlemleri ile elde ettikleri tere tohumu protein izolatlarının su tutma kapasitelerini sırasıyla 3.26,

3.86 ve 3.87 g/g olarak tespit etmişlerdir. Kontrol örneğinin en düşük su tutma kapasitesine sahip olması, E+KE ve E+UDE örneklerinin daha yüksek saflığa sahip olması ile açıklanmıştır (Turker ve Isleroglu, 2024). Ayrıca, fesleğen tohumu proteinlerinin yüksek su tutma kapasitesi, izolatların genişleme ve açılma yeteneklerinin yüksek olmasına ve böylece ek bağlanma bölgelerinin açığa çıkmasına bağlanabilir (Kaur ve Singh, 2007). Perović ve ark. (2022) nohut tohumu protein ekstraksiyonunda klasik ekstraksiyon ile selüloz, ksilanaz ve arabinofuranosidaz enzimleri kullanarak enzimatik ön işlemlili klasik ekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlardır. Selüloz ve ksilanaz kombinasyonu kullanılarak üretilen örneklerin su tutma kapasitesinin (~2.7 g/g) klasik ekstraksiyon işlemi ile üretilen örneklerden (~1.2 g/g) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, enzimatik ön işlem uygulanan proteinlerin yapılarındaki fraksiyonel değişikliklerin fonksiyonel özellikler üzerine etki edebileceği ifade edilmiştir (Perović ve ark., 2022). Yang ve ark. (2024b) kinoaadan protein ekstraksiyonu için klasik ekstraksiyon, alkali proteaz ile enzim destekli ekstraksiyon, UDE ve enzimatik ekstraksiyon işlemlerinin kombinasyonunu kullanmışlardır. Klasik ekstraksiyon ile elde ettikleri örneğin su tutma kapasitesini 0.8 g/mL, UDE ve enzimatik ekstraksiyon işlemlerinin kombinasyonu ile elde ettikleri örneğin su tutma kapasitesini ise ~1.7 g/mL olarak tespit etmişlerdir. Su tutma kapasitesinde gözlenen bu artışın, protein çözünürlüğündeki artış ve partikül boyutundaki küçülmeyle ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2024b). Literatürde gerçekleştirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığında fesleğen tohumunun yüksek bir su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. E+UDE işleminin sağladığı yüksek çözünürlük ve hidrofilik kısımların açığa çıkması gibi etkileşimlerin fesleğen tohumundan elde edilen protein izolatlarındaki su tutma kapasitesindeki artışı açıklayabilmektedir (Ochoa-Rivas ve ark., 2017; Mir ve ark., 2019; Yang ve ark., 2024b).

Bir proteinin izolatının yağ tutma kapasitesi, protein izolatı ağırlığı başına emilen yağ miktarının bir ölçüsüdür (Cheftel ve ark., 1985). Yüksek yağ absorpsiyonu gerçekleştirebilen proteinlerin işlenmiş et ürünleri, kek hamurları, mayonez ve salata sosları gibi ürünlerde kullanılabileceği bildirilmiştir (Butt ve Rizwana Batool, 2010). Fesleğen tohumundan elde edilen protein izolatlarının yağ tutma kapasitesi 3.09-3.75 g/g olarak belirlenmiş, en düşük yağ tutma kapasitesi kontrol protein izolatı için tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.4). E+KE ve E+UDE protein izolatlarının yağ tutma

kapasiteleri arasında istatistiksel anlamda bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.4). Turker ve Isleroglu (2024) tere tohumundan elde ettikleri protein izolatlarının yağ tutma kapasitelerini kontrol örneği için 4.5 g/g, E+KE örneği için 4.9 g/g, E+UDE örneği için 5.1 g/g olarak belirlemişlerdir. Tere tohumu proteinlerinde gözlenen bu yüksek yağ tutma kapasitelerinin, sonikasyon işlemi sonucunda protein yapısındaki hidrofobik grupların açığa çıkmasıyla açıklanabileceği bildirilmiştir (Resendiz-Vazquez ve ark., 2017; Turker ve Isleroglu, 2024). Isleroglu ve Olgun (2024) klasik ekstraksiyon işlemi ile çemen otu tohumu protein izolatu elde ettikleri çalışmada yağ tutma kapasitesini 2.0 g/g olarak tespit etmişler, Turker ve ark. (2024) ise UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu için yağ tutma kapasitesi değerini 3.68 g/g olarak belirlemişlerdir. Çemen otu tohumu protein izolatu için UDE işlemi ile yağ tutma kapasitesinin %84 oranında artırıldığı iki farklı çalışma ile ortaya konmuştur. Gadalkar ve Rathod (2020) UDE işlemiyle elde ettikleri karpuz çekirdeği protein izolatının yağ tutma kapasitesini (3.4 g/mL) klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen örneklerle karşılaştırmışlar (2.71 g/mL), UDE işlemi ile üretilen protein izolatının %25 daha yüksek yağ tutma kapasitesine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Bu durumun ultrasonik dalgaların proteinler arasındaki hidrofilik ve elektrostatik etkileşimleri bozması sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (O'Sullivan ve ark., 2014). Ultrasonik işlem aynı zamanda proteinlerin yapısal olarak kısmen açılmasını sağlayarak daha fazla hidrofobik grubun yüzeye çıkmasına yol açmaktadır (Hu ve ark., 2013). Proteinlerin kısmi açılması, proteinlerin daha esnek hale gelmesini sağlamakta ve daha fazla polar ve apolar amino asidin yağ ile temas etmesine imkan tanıyarak yağ tutma kapasitesini artırmaktadır (Gadalkar ve Rathod, 2020). Fesleğen tohumu protein izolatu için de benzer durumun varlığı elde edilen sonuçlar ile ortaya konmuştur (Çizelge 4.4). Fesleğen tohumu protein izolatının dikkate değer su ve yağ absorpsiyon kapasitesi, onu et ve fırıncılık sektörlerinde potansiyel bir bileşen haline getirmektedir. Ayrıca, fesleğen tohumu protein izolatının yüksek yağ absorpsiyon kapasitesi soğuk et ürünleri, özellikle sosislerde, yağ ve su arasında bağlayıcı ajan olarak görev yapabilecek değerli bir bileşen olarak öne çıkmaktadır.

Çizelge 4.4. Fesleğen tohumu protein izolatlarının su ve yağ tutma kapasiteleri

Örnek	Su Tutma Kapasitesi (g/g)	Yağ Tutma Kapasitesi (g/g)
K	3.55 (± 0.00) ^b	3.09 (± 0.06) ^b
E+KE	5.00 (± 0.08) ^a	3.75 (± 0.07) ^a
E+UDE	5.21 (± 0.08) ^a	3.82 (± 0.02) ^a

^{a,b}Aynı sütunda verilen farklı harfe sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

4.2.4 Emülsifikasyon Özellikleri

Fesleğen tohumu protein izolatlarının emülsifikasyon özellikleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Emülsiyon özellikleri emülsiyon stabilitesi, emülsiyon kapasitesi ve emülsiyon aktivitesi değerlerinin tespiti ile verilmiştir. Emülsiyon stabilitesi zaman içerisinde bulanıklıkta meydana gelen değişikliklerin izlenmesi yoluyla değerlendirilir ve bu değişiklikler üzerinden emülsiyonun uzun vadeli dayanıklılığı belirlenir (Kiosseoglou ve ark., 2021). Emülsiyon kapasitesi, belirli bir miktar protein tarafından emülsifiye edilebilen maksimum yağ miktarını ifade etmekte olup, bu değer genellikle yüzde olarak verilmektedir (Pearce ve Kinsella, 1978). Emülsiyon aktivitesi ise spektrofotometrik ölçümlerle, bulanıklık esas alınarak belirlenir ve birim protein başına oluşturulan maksimum emülsiyon yüzey alanı olarak tanımlanır (Yi-Shen ve ark., 2018). Elde edilen sonuçlara göre, tüm emülsifikasyon özellikleri bakımından kontrol örneği en düşük değerlere sahip olmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.5). Emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon aktivitesi için en yüksek değerler E+UDE örneklerinde elde edilmiş ($p < 0.05$), emülsiyon kapasitesi için E+KE ve E+UDE örnekleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.5). Enzimatik ön işlem ve UDE işleminin fesleğen tohumu protein izolatının emülsifikasyon özelliklerini genel olarak artırdığı ortaya konulmuştur (Çizelge 4.5). Isleroglu ve Olgun (2024) çemen otu proteinlerini klasik ekstraksiyon ile elde ettikleri çalışmada emülsiyon stabilitesini 28.73 dakika, emülsiyon kapasitesini %26.52 ve emülsiyon aktivitesini 78.21 m²/g olarak belirlemişlerdir. Turker ve ark. (2024) çemen otu tohumundan UDE ile elde ettikleri protein izolatı için ise emülsiyon stabilitesini 34.65 dakika, emülsiyon kapasitesini %31.19 ve emülsiyon aktivitesini 73.86 m²/g olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar

incelendiğinde, emülsiyon aktivitesi haricinde diğer parametrelerin UDE işlemi ile artırıldığı görülmüştür. Turker ve Isleroglu (2024) tere tohumundan elde ettikleri protein izolatlarında kontrol, enzim ön işlemlili klasik ekstraksiyon ve enzim ön işlemlili UDE örneklerinin emülsiyon stabilite değerlerini 19.6, 20.1, ve 20.2 dakika, emülsiyon kapasitesi değerlerini %39.4, %47.8 ve %49.4, emülsiyon aktivitesi değerlerini ise 71.5, 71.7 ve 72.1 m²/g olarak tespit etmişlerdir. Enzimatik ön işlem ve UDE uygulamasının protein izolatlarının emülsifikasyon özelliklerini artırdığı gözlenmiştir (Turker ve Isleroglu, 2024). Perović ve ark. (2020) soya tohumlarından enzim destekli klasik ekstraksiyon işlemi ile protein izolatu eldesi amacıyla selüloz, ksilanaz ve pektinaz enzimlerini kullanmışlardır. Bu üç enzimin karışımı ve klasik ekstraksiyon işleminin bir arada uygulanması ile elde edilen protein izolatu örneğinin yalnızca klasik ekstraksiyon uygulanan örneğe göre daha yüksek emülsiyon aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Perović ve ark., 2020). Yang ve ark. (2024b) kinoaadan protein ekstraksiyonu için klasik ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon (alkali proteaz), UDE ve enzimatik ekstraksiyon işlemlerinin kombinasyonunu kullanmışlardır. Ultrasonikasyon ve enzim desteğinin kombinasyonu ile elde edilen protein izolatu örneklerinin emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon aktivitesi değerlerinin klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen örneklere oranla 2.56 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2024b). Sonikasyon ve enzimatik işlemin proteinler üzerindeki sinerjistik etkisinin emülsiyon özelliklerini artırdığı tahmin edilmektedir (Yang ve ark., 2024b). Fesleğen proteinlerinin üç boyutlu yapısında minör konformasyonel değişikliklerin hem enzimatik işlem hem de sonikasyon uygulaması ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bu yapısal değişiklikler protein moleküllerinin su-yag arayüzeyine artan oranda adsorbe olmasını da sağlamaktadır (Yao ve ark., 2023).

Çizelge 4.5. Fesleğen tohumu protein izolatlarının emülsifikasyon özellikleri

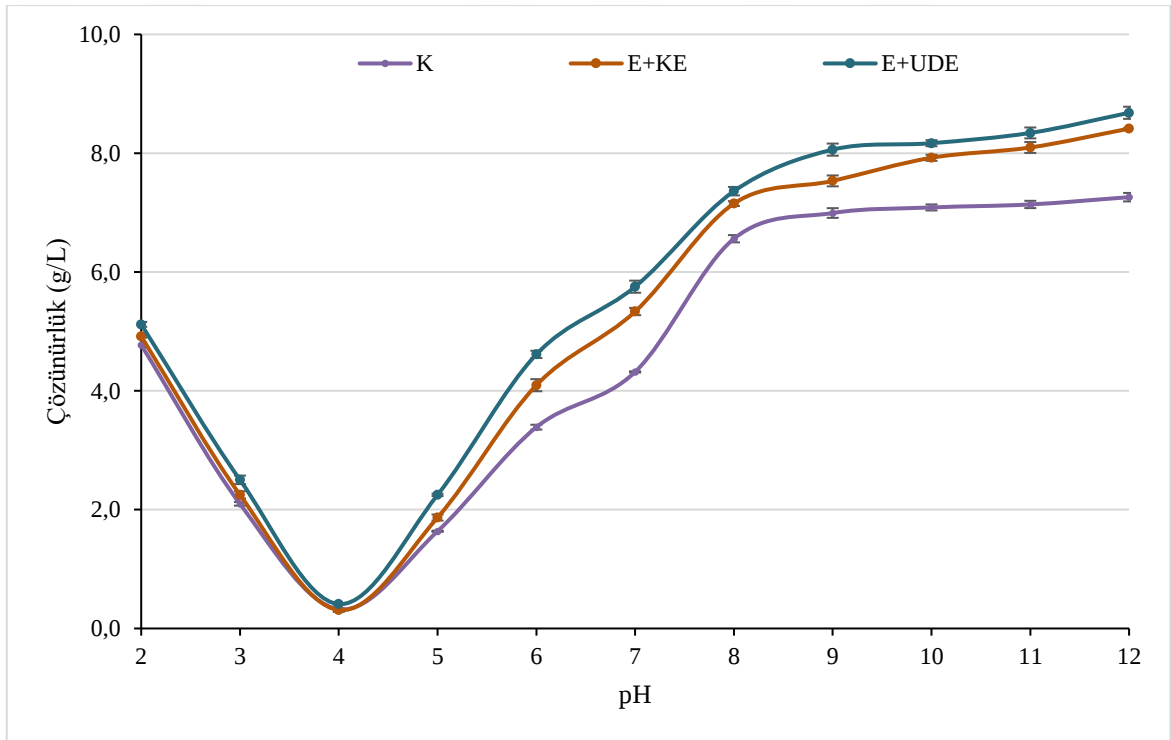
Örnek	Emülsiyon Stabilitesi (dak)	Emülsiyon Kapasitesi (%)	Emülsiyon Aktivitesi (m ² /g)
K	29.63(±0.21) ^c	54.44(±1.57) ^b	76.81(±0.11) ^c
E+KE	31.07(±0.25) ^b	63.33(±1.57) ^a	77.49(±0.24) ^b
E+UDE	32.99(±0.96) ^a	67.78(±1.57) ^a	80.04(±0.37) ^a

^{a-c}Aynı sütunda verilen farklı harfe sahip ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

4.2.5 Çözünürlük Özellikleri

Fesleğen tohumundan farklı yöntemlerle elde edilen protein izolatlarının farklı pH'lardaki çözünürlükleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatlarının çözünürlüğü pH 4.0'te en düşük (kontrol örneğinde 0.32 g/L, E+KE örneğinde 0.31 g/L, E+UDE örneğinde ise 0.41 g/L), pH 12.0'de en yüksek (kontrol örneğinde 7.26 g/L, E+KE örneğinde 8.41 g/L, E+UDE örneğinde ise 8.68 g/L) olacak şekilde belirlenmiştir. pH 4.0'ten düşük ve yüksek değerlerde proteinlerin çözünürlüğünün arttığı, bu artışın yüksek pH'larda daha fazla olduğu ve pH 9.0'dan sonra artış hızının yavaşladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Benzer durum, soya (Ge ve ark., 2021) ve kolza tohumu (Gerzhova ve ark., 2015) protein izolatları için de belirlenmiş, pH 4.0-5.0'te çözünürlüğün en düşük ve bu aralığın üstünde ve altında ise artış gösterdiği gözlenmiştir. Çözünürlüğün pH 4.0'ten düşük ve yüksek pH'larda artış göstermesi güçlü asit/alkali koşulları altında proteinlerin yüzeylerinde pozitif/negatif yükler edinmesi ve bunun moleküllerin itilmesini desteklemesi ve dolayısıyla protein çözünürlüğünü artırmasından kaynaklanmaktadır (Li ve ark., 2020a). İzoelektrik noktada ise protein eşit sayıda pozitif ve negatif yük içerir ve sıfır net yük oluşturur (Aluko, 2024). Proteinler izoelektrik pH'larına yakın olduğunda yük nötralizasyonundan kaynaklanan elektrostatik itme azalır ve bu da minimum çözünürlüğe neden olur (Barrera ve ark., 2006). Fesleğen tohumu protein izolatu için çözünürlük pH 4.0'te en düşük olduğu için izoelektrik nokta pH 4.0 olarak belirlenmiştir. Alkali pH'larda ise proteinler maksimum çözünürlük gösterir. Elektrostatik itme ve yüklü kalıntıların hidrasyonu, suyla etkileşimi teşvik ederek proteinlerin çözünmesine neden olur (Barrera ve ark., 2006).

E+UDE örneklerine ait çözünürlüklerinin tüm pH değerlerinde diğer örneklerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). En yüksek protein çözünürlüğü (8.68 g/L) pH 12.0'de E+UDE örneğinde gözlenmiştir. Fatima ve ark. (2023) *Moringa oleifera* tohumlarından UDE işlemi ile protein ekstraksiyonunda ultrason uygulamasının protein çözünürlüğünün arttırdığını bildirmişlerdir. Bu artış, parçacık boyutundaki azalmanın yanı sıra moleküler yapıda ve konformasyondaki değişiklikler nedeniyle daha fazla hidrofilik grubun açığa çıkması ile açıklanmıştır. Peynir altı suyu proteininin (Jambrak ve ark., 2008) ve bezelye proteininin (Jiang ve ark., 2017) çözünürlüğünde de ultrason uygulaması ile artış görüldüğü bildirilmiştir.

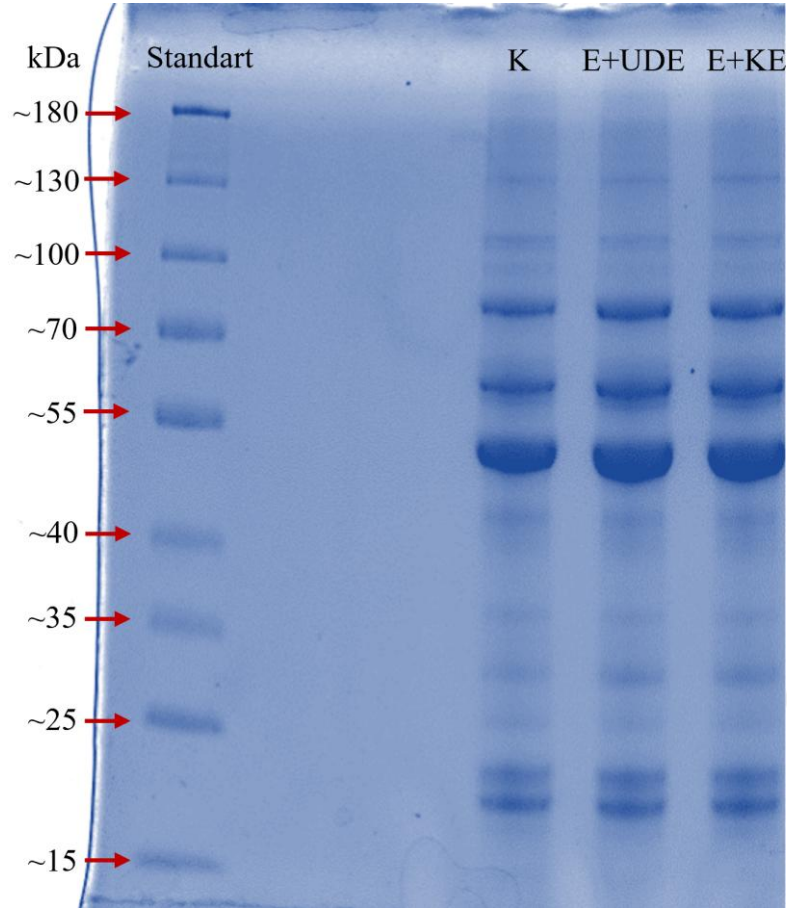


Şekil 4.2. Fesleğen tohumu protein izolatlarının çözünürlükleri

4.2.6 Moleküler ağırlık

Fesleğen tohumu protein izolatlarının molekül ağırlıklarının tespiti amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970). Üç farklı yöntem ile elde edilen protein izolatları için benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.3). Fesleğen tohumu protein izolatları için moleküler ağırlık dağılımının ~22 kDa ile ~82 kDa aralığında olduğu belirlenmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatları için yaklaşık 22, 23, 49, 63 ve 82 kDa

molekül ağırlıklarında 5 adet belirgin bant tespit edilmiştir. Nazir ve Wani (2023) fesleğen tohumu protein izolatlarının moleküler ağırlıklarını belirlemişler ve 17, 22.7, 25.1, 30.3, 35.8 ve 77.6 kDa molekül ağırlıklarında belirgin bantlar tespit etmişlerdir.



Şekil 4.3. Fesleğen tohumu protein izolatları için SDS-PAGE jel görüntüsü

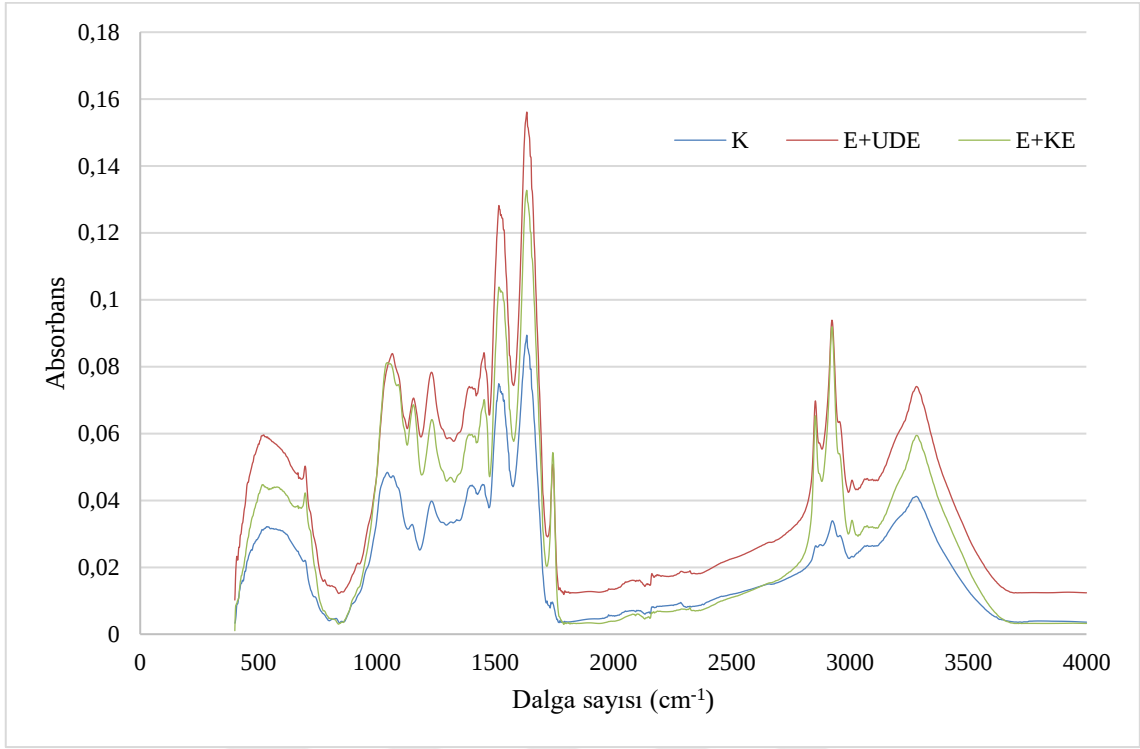
4.2.7 Yapısal özellikler

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen fesleğen tohumu protein izolatlarının yapısal özellikleri Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ile belirlenmiştir. FT-IR, kızılötesi radyasyonun kimyasal bağlar tarafından absorbe edilmesi ve moleküllerin gerilme, bükülme gibi titreşim hareketleri sonucunda spektral pikler oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu pikler, fonksiyonel gruplara özgüdür (Kılıç ve Karahan, 2010). Proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde FT-IR spektrumunda Amid I bölgesi ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) esas alınmaktadır. Bu bölgede yaklaşık %80 oranında

peptit bağındaki C=O gerilme titreşimi ve %20 civarında N–H bükülme titreşimi izlenmektedir (Kong ve Yu, 2007; Carbonaro ve ark., 2008). Şekil 4.4'te kontrol, E+KE ve E+UDE örneklerine ait FT-IR spektrumları gösterilmiştir.

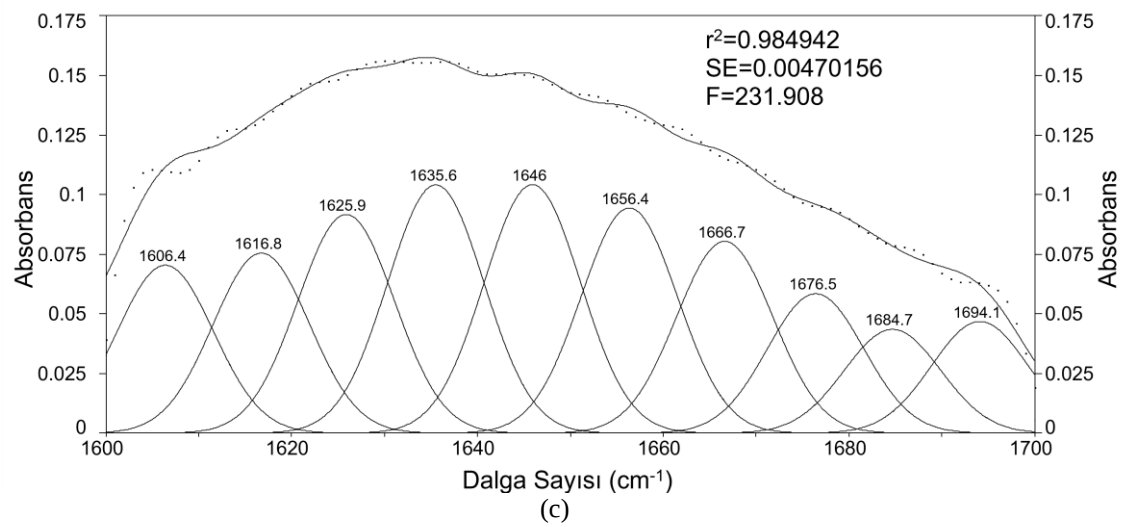
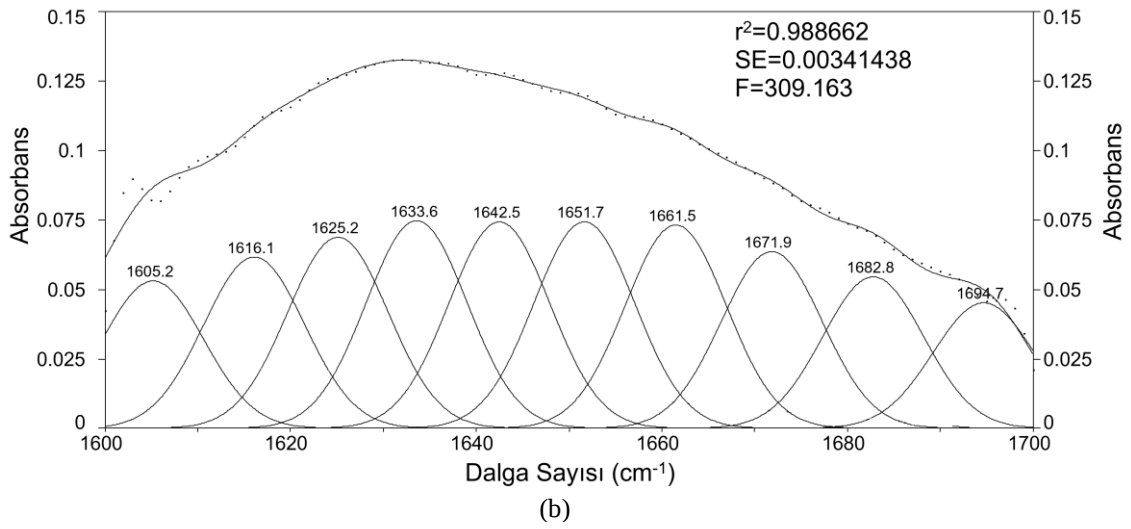
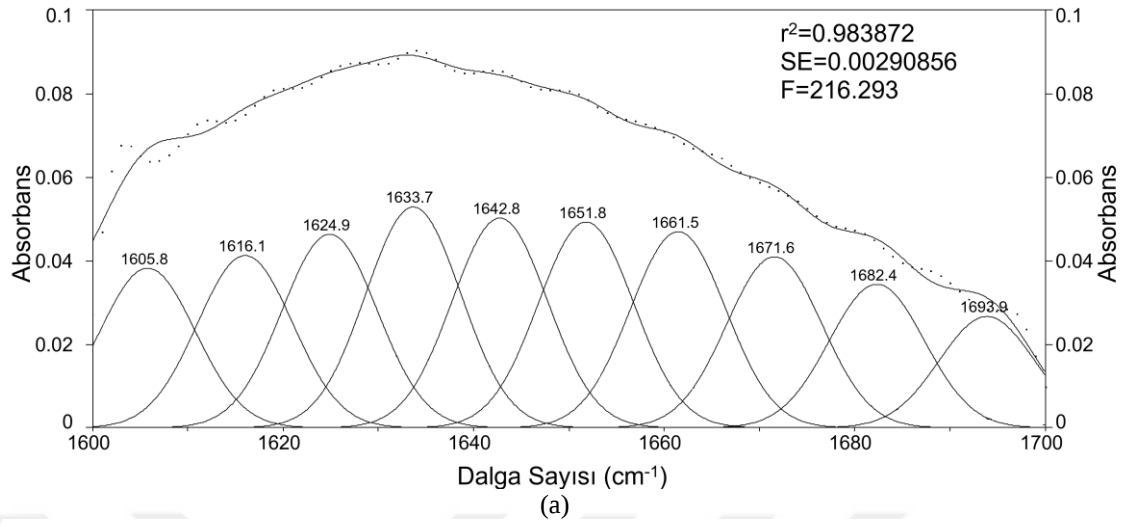
Protein izolatlarının FT-IR spektrumları incelendiğinde, farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen protein izolatları arasında belirgin farklılıklar gözlenmemiştir (Şekil 4.4). Amid I bandı, tüm protein izolatları için $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Amid II bölgesi ise $1480-1585\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında yer alır ve %40-60 civarında N–H bükülme titreşimi, %18-40 civarında C–N gerilme titreşimi izlenir (Withana-Gamage ve ark., 2011). Amid II bölgesinde 1522 , 1534 ve 1539 cm^{-1} dalga boylarında elde edilen pikler Amid II bölgesine ait olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.4). Amid I ve Amid II bantlarının tespiti, protein yapısının varlığının mutlak bir göstergesi olarak kabul edilir (Withana-Gamage ve ark., 2011). Amid III bölgesi $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında izlenir ve protein ile karbonhidratlar gibi diğer makromoleküller arasındaki etkileşimlerin varlığını gösterir (Barth ve Zscherp, 2002; de la Rosa-Millán ve ark., 2018). Bu bölgede C–N gerilme titreşimleri ve N–H bükülme titreşimi izlenir (Barth ve Zscherp, 2002). 1234 , 1239 , 1240 , 1392 , 1395 ve 1398 cm^{-1} dalga boylarında elde edilen pikler, fesleğen tohumu protein izolatları için Amid III bölgesinin varlığını gösterir (Şekil 4.4).

Fesleğen tohumu protein izolatlarının ikincil yapıları, FT-IR spektrumunda Amid I bandı bölgesindeki ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) pikler kullanılarak belirlenmiştir. Piklerin merkez noktaları, protein ikincil yapı yüzdelerinin belirlenmesi için kullanılmış ve her pik için hesaplanan alanlar değerlendirilmiştir. Proteinlerin Amid I bandında α -heliks, β -tabaka, rastgele halka veya β -kıvrılma gibi bileşenler bulunur (Barth, 2007). β -tabaka yapısı, $1612-1640$ ve $1689-1695\text{ cm}^{-1}$ (Kong ve Yu, 2007), α -heliks yapısı $1651-1660\text{ cm}^{-1}$ (Van Stokkum ve ark., 1995; Wang ve ark., 2020), rastgele halka yapısı $1641-1650\text{ cm}^{-1}$ (Purcell ve ark., 1999; Van Stokkum ve ark., 1995) ve β -kıvrılma yapısı $1661-1688\text{ cm}^{-1}$ (Wang ve ark., 2020) dalga sayılarında gözlenir.



Şekil 4.4. Fesleğen tohumu protein izolatlarına ait FT-IR spektrumu

Tüm protein izolatları için Amid I bandı bölgesinde 10 adet pik gözlenmiş ve bu piklerin alanları, protein ikincil yapısındaki fraksiyonların yüzdesini belirlemek için kullanılmıştır (Şekil 4.5). Protein ikincil yapı fraksiyonlarının yüzdelere ait sonuçlar ise Çizelge 4.6’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, ikincil yapı yüzdelерinin genel olarak tüm protein izolatları için benzer olduğu ve β -tabaka yapısının en yüksek orana sahip olduğu gözlenmiştir. β -tabaka yapıların yüksek oranda bulunması, protein izolatlarının yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu gösterir (Wang ve ark., 2020). Bazı bitkisel kaynaklardan elde edilen protein izolatlarının ikincil yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur. Endüstride önemli bir protein kaynağı olarak kabul edilen soya protein izolatının β -tabaka yapısının en yüksek orana sahip olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011). Kenevir tohumlarından elde edilen protein izolatında sonikasyon uygulamasının β -tabaka yapısını ~%6 arttığı bulunmuştur (Karabulut ve ark., 2022). Turker ve Isleroglu (2024) tere tohumu protein izolatı için tez çalışmasındaki yöntemle benzer şekilde E+UDE örneği için kontrol örneğine oranla β -tabaka yapısında ~%5’lik bir artış tespit etmiştir. Bu çalışmada, kontrol ve E+UDE örnekleri için de benzer sonuçlar elde edilmiş ve UDE işlemi ile β -tabaka yapısında yaklaşık %7’lik bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.5. Protein izolatlarına ait Amid I bantları (a) kontrol (b) E+KE ve (c) E+UDE

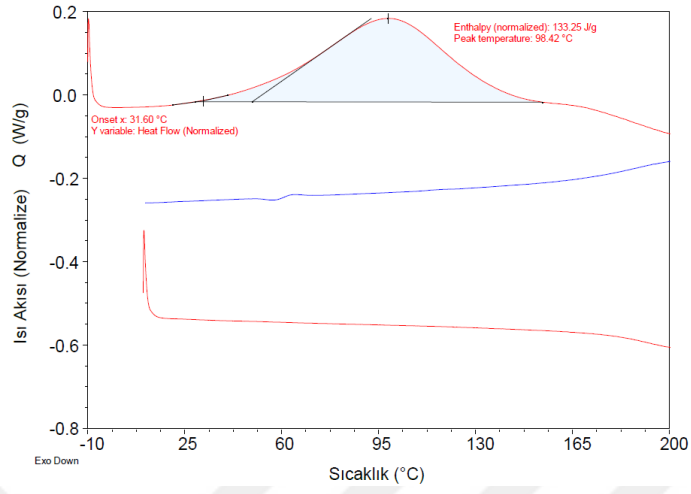
Çizelge 4.6. Protein ikincil yapı fraksiyonlarının yüzde (%) oranları

Örnek	β -tabaka	Rastgele Halka	α -heliks	β -kıvrılma	Yan Halka
K	40.66	12.48	12.22	26.44	8.20
E+KE	42.95	10.59	9.53	30.91	6.02
E+UDE	43.69	10.81	9.01	30.95	5.54

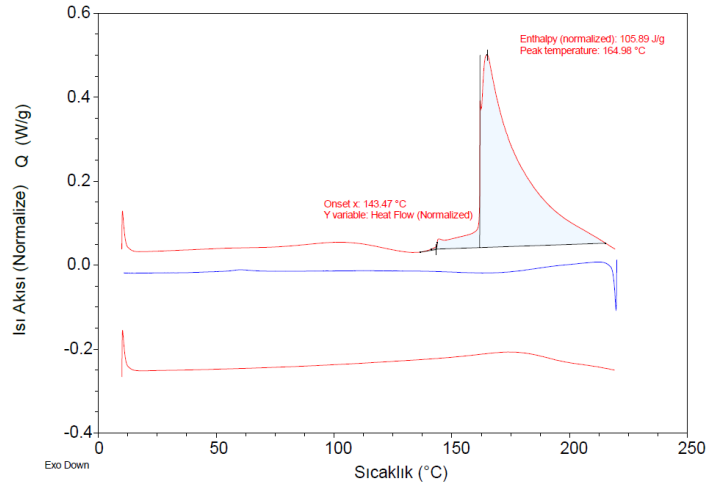
K: Kontrol protein izolatu, E+KE: Enzimatik ön işlem ve klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, E+UDE: Enzimatik ön işlem ve ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.2.8 Termal özellikler

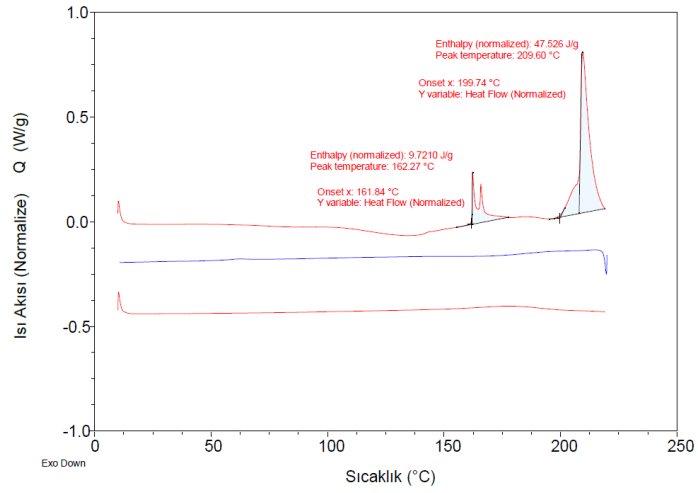
Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen fesleğen tohumu protein izolatlarının denatürasyon sıcaklıkları (T_d) ve denatürasyon entalpileri (ΔH_d) Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) termogramları kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.6’da sunulan termogramlar incelendiğinde, denatürasyonun gerçekleşmesi için enerji gerektiği ve bunun endotermik piklerle ortaya konduğu görülmüştür. Denatürasyon sıcaklıkları kontrol, E+KE ve E+UDE örnekleri için sırasıyla 98.42, 164.98 ve 209.60°C olarak belirlenmiştir. Denatürasyon entalpi değerleri (ΔH_d) ise kontrol, E+KE ve E+UDE örnekleri için sırasıyla 133 J/g, 105.89 J/g ve 47.53 J/g olarak belirlenmiştir (Şekil. 4.6). Proteinlerin ısıl stabilitesine kovalent etkileşimlerin yanı sıra hidrofobik etkileşimler de etki etmektedir (Olivos-Lugo ve ark., 2010). Rashid ve Gülseren (2024) fesleğen tohumu protein izolatlarının ve farklı fraksiyonlarının denatürasyon sıcaklıklarının 93-142°C aralığında değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, fesleğen tohumunda yüksek oranda bulunan β -tabaka ve β -kıvrılma yapılarının termal stabiliteyi artırdığını belirtmişlerdir. Tez çalışmasında da benzer şekilde, protein izolatlarında en yüksek oranda bulunan ikincil yapıların β -tabaka ve β -kıvrılma olduğu tespit edilmiştir. Literatürde, börülce protein izolatu için 91°C (Shevkani ve ark., 2015), kenevir tohumu protein izolatu için 95°C (Tang ve ark., 2006) ve ayva çekirdeği protein izolatu için 103°C (Deng ve ark., 2019) denatürasyon sıcaklıkları rapor edilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.6. DSC termogramları (a) kontrol, (b) E+KE, (c) E+UDE

4.2.9 Amino asit kompozisyonu

Amino asit kompozisyonunu belirlemek amacıyla E+UDE örneği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de sunulmuştur. Fesleğen tohumu protein izolatının toplam esansiyel amino asit miktarı 327.51 g amino asit/kg protein izolatı olarak belirlenmiş olup, lösin içeriğinin yüksek, histidin, treonin ve metiyonin miktarının ise düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Genelde tahıl ürünlerinin düşük lizin, yüksek histidin ve metiyonin miktarına sahip olduğu göz önüne alındığında (Galili ve Amir, 2013), fesleğen tohumu protein izolatının kek, ekmek ve atıştırmalıklar gibi fırıncılık ürünlerinde kullanılması ile besin kalitesinin artırılabilceği düşünülmektedir. Esansiyel amino asitlerden lösin ve lizin, esansiyel olmayan amino asitlerden ise arjinin ve glutamik asit miktarlarının diğer amino asitlere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Gorissen ve ark. (2018) ticari olarak farklı bitkisel kaynaklardan (soya, mısır, keten tohumu, çeltik) üretilen protein izolatlarının amino asit kompozisyonlarını belirlemişler ve bitkisel kaynaklı proteinlerde metiyonin içeriğinin hayvansal kaynaklı proteinlere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen protein izolatlarında esansiyel amino asit ve lösin içeriğinin düşük olduğunu bildirilmiş olsa da (Gorissen ve ark., 2018) tez kapsamında fesleğen tohumu protein izolatları için lösin ve esansiyel amino asit içeriğinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Bu durum, fesleğen tohumu protein izolatının besinsel kalitesini ortaya koymakla beraber yeni ve fonksiyonel ürünlerde kullanım potansiyelini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Fesleğen tohumu protein izolatına ait amino asit kompozisyonu

Esansiyel Amino Asitler (g amino asit /kg protein izolatı)		Esansiyel Olmayan Amino Asitler (g amino asit /kg protein izolatı)	
Histidin	17.96	Tirozin	26.55
Treonin	20.73	Aspartik asit	23.60
Valin	46.28	Glutamik asit	82.18
Metiyonin	23.58	Serin	21.40
Fenilalanin	47.24	Glisin	49.42
İsolösin	45.51	Arjinin	64.38
Lösin	69.96	Alanin	42.46
Lizin	56.25	Prolin	45.92
		Triptofan	10.15
<i>Toplam</i>	327.51	<i>Toplam</i>	366.06

Temel amino asitler; lizin, arjinin ve histidin (138.59 g amino asit /kg protein izolatı), asidik amino asitler; aspartik asit ve glutamik asit (105.78 g amino asit /kg protein izolatı), hidrofobik amino asitler; alanin, izolösin, lösin, metiyonin, fenilalanin, valin, prolin ve triptofan (331.10 g amino asit /kg protein izolatı), yüksüz polar amino asitler; glisin, serin, tirozin ve treonin (118.10 g amino asit /kg protein izolatı), yüklü polar amino asitler temel amino asitler ve asidik amino asitlerin tümü (244.37 g amino asit /kg protein izolatı); sülfür içeren amino asitler ise metiyonin (23.58 g amino asit /kg protein izolatı) olacak şekilde sınıflandırılmaktadır (De Groot ve ark., 1969). Bu sınıflandırmaya uygun olarak amino asit miktarları incelendiğinde hidrofobik amino asitlerin miktarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Hidrofobik amino asitlerin fazla miktarda bulunması, proteinin daha kompakt ve düzgün dağılımlı bir yapıya sahip olmasını sağlamakta ve bu durum denatürasyon sıcaklıklarının oldukça yüksek olmasına neden olabilmektedir (Zuber, 1988). Fesleğen tohumu proteinlerinde hidrofobik karakter gösteren amino asitlerin fazla miktarda olması sahip olduğu yüksek ısıl stabilitesinin sebepleri arasında gösterilebilir. Fesleğen tohumu protein izolatında sülfür içeren amino asitlerin (metiyonin) ise düşük miktarda bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

4.3 Fesleğen Tohumu Protein İzolatından Biyoaktif Peptit Üretimi

Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatlarında enzimatik hidroliz işlemi ile biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan enzimatik hidroliz işlemine ait deneysel tasarım ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir. En yüksek hidroliz derecesi (%72.38) ve en yüksek DPPH inhibisyonu (%40.47) enzim:substrat oranının %15, alkalaz:flavourzyme oranının 0.5 U/U, hidroliz süresinin 240 dakika olduğu koşullarda elde edilmiştir. En düşük hidroliz derecesi (%14.04) ve en düşük DPPH inhibisyonu (%7.91) enzim:substrat oranının %0.5, alkalaz:flavourzyme oranının 0.5 U/U ve hidroliz süresinin 60 dakika olduğu koşullarda belirlenmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatının enzimatik hidrolizi sonucunda hidroliz derecesi arttıkça DPPH inhibisyonu da artış göstermiştir (Çizelge 4.8) Sbroggio ve ark. (2016) soya küspesi protein hidrolizatından alkalaz ve flavourzyme kullanarak biyoaktif peptit elde ettikleri çalışmada, hidroliz derecesinin artışı ile antioksidan aktivite değerlerinin artış gösterdiğini bulgulamışlardır. Benzer şekilde, Jamdar ve ark. (2010) yer fıstığı protein izolatından alkalaz kullanarak elde ettikleri biyoaktif peptitlerde hidroliz derecesinin artışı ile DPPH inhibisyonunun artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Protein hidrolizatlarının yüksek hidroliz derecesi değerlerinde ABTS ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitelerindeki artış, biyoaktif peptitlerin elektron ve hidrojen aktarım özelliklerindeki artışa bağlanabilir (Sbroggio ve ark., 2016). Bu peptitler, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları daha kararlı ürünlere dönüştürdükleri için radikal zincir reaksiyonunu durdurabilmektedirler (Pazinatto ve ark., 2013). Tez çalışmasında, aynı hidroliz derecesi ve aynı enzim miktarı koşullarında enzim:substrat oranı arttıkça hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu artış göstermiştir. Benzer şekilde, Zang ve ark. (2019) artan enzim konsantrasyonlarında proteinlerin hidroliz derecesinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Aynı enzim:substrat oranı ve aynı hidroliz süresi koşullarında alkalaz enziminin flavourzyme’a göre daha fazla hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu sağladığı belirlenmiştir. Buna karşın yüksek enzim:substrat oranı (%15) ve yüksek hidroliz süresinde (240 dak) alkalaz:flavourzyme oranı 0.5 U/U olduğu durumda daha yüksek hidroliz derecesi (%72.38) ve DPPH inhibisyonu (%40.47) elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Genel olarak, yalnızca alkalaz kullanılan durumlarda yalnızca flavourzyme kullanılan

durumlara göre daha yüksek hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu gözlenmiştir. Ayrıca, alkalaz:flavourzyme oranı 0.5 U/U olduğu durumlarda en yüksek değerlere ulaşılmıştır (Çizelge 4.8). Vaştag ve ark. (2011) kabak çekirdeği posasından elde edilen protein izolatına alkalaz ve flavourzyme kullanarak enzimatik hidroliz işlemi uygulamışlardır. Aynı başlangıç enzim:substrat oranıyla tüm hidroliz periyodu boyunca yalnızca alkalaz kullanılan hidrolizatlarda, yalnızca flavourzyme kullanılanlara göre daha yüksek hidroliz derecesine ulaşılmıştır. Hunsakul ve ark. (2022) pirinç kepeği protein izolatından alkalaz ve flavourzyme kullanarak elde ettikleri hidrolizatlarda alkalaza flavourzyme ilavesi ile daha yüksek hidroliz derecesi ve antioksidan aktiviteye ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.8. Fesleğen tohumu protein izolatına uygulanan enzimatik hidroliz işlemi

Enzim: Substrat oranı (%)	Alkalaz: Flavourzyme oranı (U/U)	Hidroliz Süresi (dak)	Hidroliz Derecesi (%)	DPPH İnhibisyon (%)
0.5	0	150	18.22 (± 0.26)	10.76 (± 0.85)
7.75	0.5	150	65.68 (± 1.62)	36.53 (± 0.44)
15	0	150	55.35 (± 0.30)	30.20 (± 0.74)
7.75	0.5	150	65.19 (± 0.22)	35.91 (± 0.14)
7.75	0	240	50.15 (± 0.46)	27.83 (± 0.45)
15	0.5	60	52.90 (± 0.75)	29.57 (± 0.50)
0.5	0.5	240	30.10 (± 0.34)	16.80 (± 0.44)
7.75	1	240	59.84 (± 0.50)	33.24 (± 0.23)
15	1	150	65.11 (± 0.35)	36.42 (± 0.47)
15	0.5	240	72.38 (± 0.30)	40.47 (± 0.68)
0.5	1	150	24.13 (± 0.72)	13.29 (± 0.34)
0.5	0.5	60	14.04 (± 0.35)	7.91 (± 1.62)
7.75	0	60	32.30 (± 0.35)	17.78 (± 0.30)
7.75	1	60	40.01 (± 0.47)	22.45 (± 0.24)
7.75	0.5	150	65.74 (± 0.77)	37.56 (± 0.44)

Fesleğen tohumu protein izolatının enzimatik hidroliz işleminin optimizasyonu için hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu yanıt olarak kullanılmış ve ikinci dereceden polinomial bir model oluşturulmuştur. Çizelge 4.9’da verilen ANOVA tablosuna göre oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$), model uygunsuzluğunun ise istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Enzim:substrat oranı, alkalaz:flavourzyme oranı ve hidroliz süresinin, hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonuna lineer ve kuadratik etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Enzim:substrat oranı ve alkalaz:flavourzyme oranı interaksiyonunun hidroliz derecesi ve

DPPH inhibisyonuna etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$), enzim:substrat oranı ve hidroliz süresi interaksyonu ise anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Alkalaz:flavourzyme oranı ve hidroliz süresi interaksyonun da hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Faktörlerin gerçek değerleri cinsinden yazılan model eşitliği hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu için sırasıyla Eşitlik 4.3 ve Eşitlik 4.4 ile verilmiştir. R^2 , düzeltilmiş R^2 (düz- R^2), yeterli tahminleme, tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS), varyasyon katsayısı (C.V.) değerleriyle model desteklenmiştir. R^2 ve düzeltilmiş R^2 (düz- R^2)'nin birbirine yakın olması modelin istatistiksel olarak önemsiz terimler bulundurmadığının ifadesi olmuştur.

$$\text{Hidroliz derecesi (\%)} = -24.03 + 6.55X_1 + 47.79X_2 + 0.43X_3 + 0.26X_1X_2 + 1.31 \times 10^{-3}X_1X_3 - 0.27X_1^2 - 43.23X_2^2 - 1.13 \times 10^{-3}X_3^2 \quad (4.3)$$

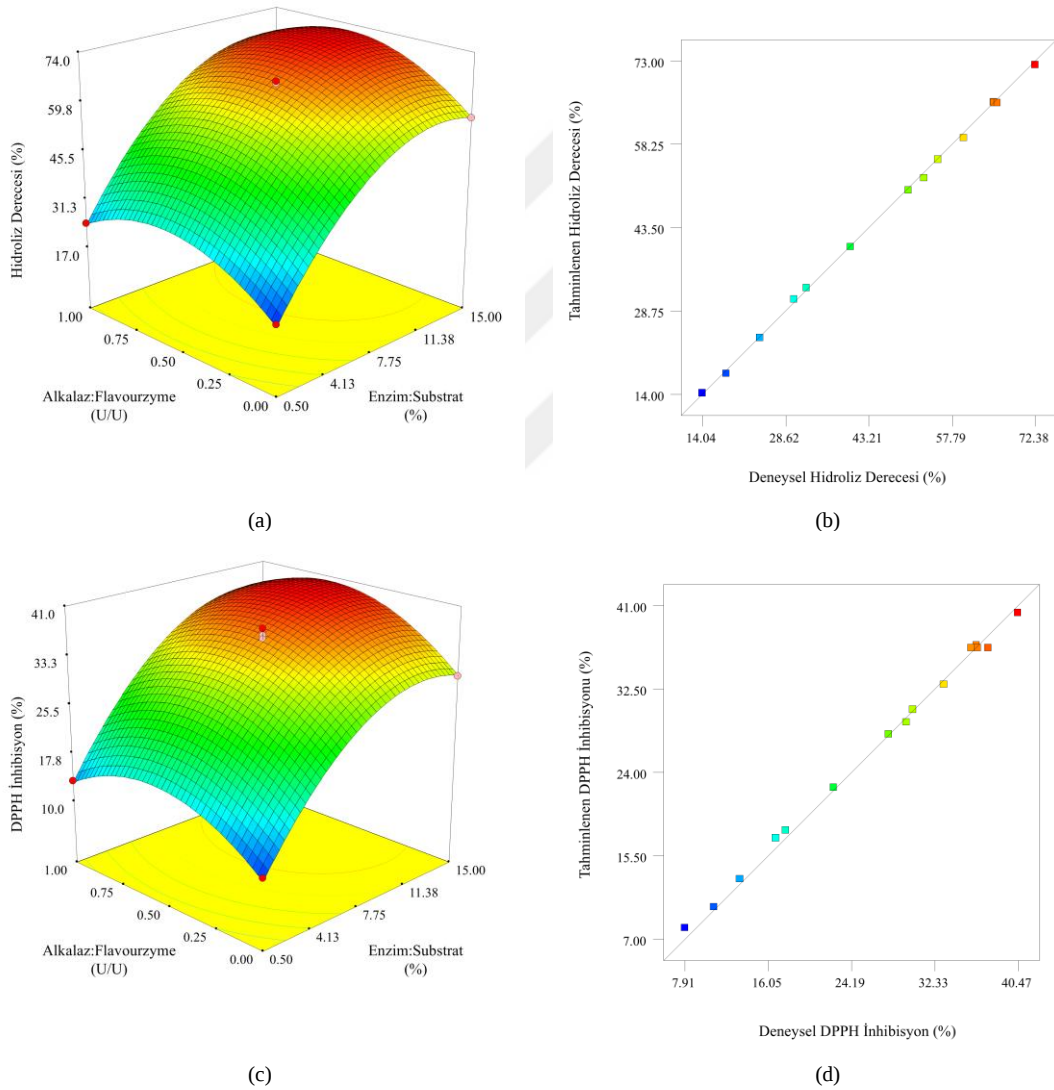
$$\text{DPPH İnhibisyon (\%)} = -13.16 + 3.58X_1 + 26.84X_2 + 0.24X_3 - 0.15X_1^2 - 24.72X_2^2 - 6.37 \times 10^{-4}X_3^2 \quad (4.4)$$

Çizelge 4.9. Enzimatik hidroliz işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı		F Değeri		p - Değeri	
		Hidroliz Derecesi	DPPH İnhibisyon	Hidroliz Derecesi	DPPH İnhibisyon	Hidroliz Derecesi	DPPH İnhibisyon
Model	9	5266.27	1627.15	1287.42	331.69	< 0.0001	< 0.0001
X ₁	1	3170.24	965.90	6975.12	1772.07	< 0.0001	< 0.0001
X ₂	1	136.61	44.35	300.58	81.37	< 0.0001	0.0003
X ₃	1	670.34	206.41	1474.88	378.69	< 0.0001	< 0.0001
X ₁ X ₂	1	3.70	3.42	8.15	6.27	0.0356	0.0543
X ₁ X ₃	1	2.92	1.01	6.43	1.86	0.0522	0.2313
X ₂ X ₃	1	0.98	0.13	2.15	0.25	0.2022	0.6403
X ₁ ²	1	726.37	225.68	1598.15	414.04	< 0.0001	< 0.0001
X ₂ ²	1	431.31	141.03	948.97	258.75	< 0.0001	< 0.0001
X ₃ ²	1	309.61	98.35	681.20	180.44	< 0.0001	< 0.0001
Kalıntı	5	2.27	2.73				
Model	3	2.09	1.32	7.67	0.63	0.1175	0.6618
Uygunsuzluğu							
Saf Hata	2	0.18	1.40				
Toplam	14	5268.54	1629.88				
		R^2	düz- R^2	Yeterli Tahminleme		PRESS	C.V. (%)
Hidroliz Derecesi		0.9996	0.9988	105.59		33.86	1.42
DPPH İnhibisyon		0.9983	0.9953	53.31		24.32	2.79

X₁: Enzim:substrat oranı (%), X₂: Alkalaz:flavourzyme oranı (U/U), X₃: Hidroliz süresi (dak) SD: Serbestlik derecesi, PRESS: Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı, C.V.: Varyasyon Katsayısı

Şekil 4.7’de bağımsız değişkenlerin hidroliz derecesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.7a) ile tahminlenen ve deneysel olarak elde edilen hidroliz derecesi arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (Şekil 4.7b) verilmiştir. Bağımsız değişkenlerin DPPH inhibisyonuna etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.7c’de, tahminlenen ve deneysel DPPH inhibisyonu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik ise Şekil 4.7d’de gösterilmiştir. Oluşturulan modelin uygunluğu tahminlenen değerler ile deneysel verilerin birbirine olan yakınlığı ile de doğrulanmıştır.



Şekil 4.7. Yanıt yüzey grafikleri ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki (150 dakika hidroliz süresi): (a-b) Hidroliz derecesi, (c-d) DPPH inhibisyonu

En yüksek hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonunun sağlandığı koşullar için gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda, optimum koşullar enzim:substrat oranı %12.26, alkalaz:flavourzyme oranı 0.63 U/U ve hidroliz süresi 157.33 dakika olarak

belirlenmiştir (istenebilirlik = 1.00). Belirlenen optimum koşul için tahminlenen hidroliz derecesi %73.73 ve DPPH inhibisyonu %41.23 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda üç tekrarlı doğrulama denemeleri yapılmış ve deneysel hidroliz derecesi %73.53±0.78 ve DPPH inhibisyonu %41.08±0.65 olarak belirlenmiştir. Tahminlenen ve deneysel değerlerin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı saptanmıştır (p>0.05). Perreira ve ark. (2019) soya küspesi protein konsantresinden antioksidan aktiviteye sahip hidrolizat elde etmek için bir optimizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Merkezi tümleşik tasarım kullanılarak hazırlanan tasarımda sıcaklık, enzim:substrat, pH ve alkalaz:flavourzyme oranları bağımsız değişkenler, hidroliz derecesi ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Tasarımda en yüksek hidroliz derecesi (%26.92) 40°C, enzim:substrat oranı 3.0 U/U, pH 7.75 ve alkalaz:flavourzyme oranı 0.5 U/U için elde edilmiştir.

Alkalaz ve flavourzyme hidrolizi sonrasında optimum koşullarda elde edilen örneklerle %5 enzim:substrat oranında 40 dakika pepsin enzimi ile hidrolizasyon işlemi uygulanmıştır. Pepsin ile hidrolizasyon sonrasında hidroliz derecesi %81.72±0.11 ve DPPH inhibisyonu %55.42±0.92'ye çıkarılmıştır. Tavano (2013) alkalaz ve flavourzyme'a kıyasla daha spesifik bir enzim olan pepsinin, aromatik amino asitlerin (fenilalanin, triptofan ve tirozin) bulunduğu yerlerdeki peptit bağlarını kestiğini bildirmiştir. Alkalaz ve flavourzyme'dan sonra pepsin uygulamasının protein hidrolizatlarının yapısında daha fazla kırılma sağladığı düşünülmektedir. Alkalaz ve flavourzyme'ın peptit bağlarını kırarak oluşturduğu parçalanmış yapı, pepsin için daha fazla bağlanma yüzeyi sağlayarak hidroliz derecesinin artışına katkı sağlamış olabilir. Bu etki ile daha küçük peptitlerin veya serbest amino asitlerin açığa çıkması sağlandığı, böylelikle son ürünlerde daha yüksek hidroliz derecesi elde edildiği tahmin edilmektedir.

4.4 Fesleğen Tohumu Protein İzolatından Elde edilen Biyoaktif Peptitlerin Karakterizasyonu

Fesleğen tohumu protein izolatının enzimatik hidrolizi sonucunda belirlenen optimum koşullarda üretilen hidrolizatların ultrafiltrasyonu ile (<10 kDa fraksiyon) biyoaktif peptitler elde edilmiştir. Optimum enzimatik hidroliz koşullarında elde edilen hidrolizat ve biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteleri, şelatlama aktiviteleri, anti-hipertansif aktiviteleri, anti-diyabetik aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca, biyoaktif peptitlerin

antimikrobiyal aktiviteleri ve GİS stabiliteleri de belirlenerek karakterizasyonları sağlanmıştır.

4.4.1 Antioksidan aktivite

Fesleğen tohumu protein izolatından alkalaz ve flavourzyme kullanılarak optimum koşullarda elde edilen hidrolizatlar ve bu hidrolizatların 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilmesi ile elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteleri farklı yöntemlerle (DPPH, ABTS, hidroksil radikal süpürme ve FRAP) belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen hidrolizatlar ile biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.10'da sunulmuştur. Biyoaktif peptit fraksiyonlarının, hidrolizatlara kıyasla daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olması biyoaktif peptitlerin daha yüksek radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Biyoaktif peptitler, hidroksil radikal süpürme aktivitesinde de hidrolizatlara göre daha düşük IC₅₀ değerlerine sahiptir (Çizelge 4.10). Bu durum, fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin hidroksil radikallerini etkili bir şekilde süpürdüğünü ve dolayısıyla hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir. FRAP analizi sonuçlarına bakıldığında da biyoaktif peptitlerin antioksidan kapasitesinin hidrolizatlara göre yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10). Literatürde antioksidan aktiviteye sahip ve bitkisel kaynaklardan üretilmiş biyoaktif peptitler rapor edilmiştir. Chen ve ark. (2022) siyah fasulye protein hidrolizatları ve biyoaktif peptit fraksiyonlarının antioksidan özelliklerini incelemişler ve <3 kDa fraksiyonların DPPH yöntemi ile 67.78 µg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, siyah fasulye protein hidrolizatının (>10 kDa) ~300 µg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer şekilde, daha küçük moleküler ağırlığa sahip biyoaktif peptit olarak değerlendirilen fraksiyonların antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (Chen ve ark., 2022). Bhadkaria ve ark. (2023) fasulye (*Vigna aconitifolia* (Jacq.)) tohumu protein izolatından alkalaz kullanarak antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmişler ve <3 kDa peptit fraksiyonunun DPPH için 155 µg/mL, ABTS için 159 µg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Trigui ve ark. (2021) çörekotu proteinlerinin hidrolizasyonunu Savinase® kullanarak gerçekleştirmişler ve antioksidan aktivite gösteren biyoaktif peptit üretmeyi başarmışlardır. DPPH için IC₅₀ değeri 230 µg/mL olarak belirlenmiş ve en yüksek

antioksidan kapasitenin en yüksek hidroliz derecesine sahip hidrolizatlar için elde edildiği bildirilmiştir (Trigui ve ark., 2021). Xue ve ark. (2015) nohut proteininden elde edilen iki farklı biyoaktif peptit fraksiyonunun DPPH, ABTS ve hidroksil serbest radikal için IC₅₀ değerlerini sırasıyla 3.2-8.4, 2.3-3.6 ve 2.0-3.9 µmol/mL olarak tespit etmişlerdir. Lu ve ark. (2019) susam proteininden alkalaz ve tripsin kullanarak biyoaktif peptit elde etmişler ve farklı ultrafiltrasyon membranlar (3-10 kDa) kullanarak elde edilen fraksiyonların DPPH için 6-22, ABTS için 5-20 mg/mL IC₅₀ değerlerini tespit etmişlerdir. Chatterjee ve ark. (2015) susam protein izolatından papain, pepsin ve alkalaz kullanılarak elde edilen <3 kDa biyoaktif peptitlerin IC₅₀ değerlerini 30.4-50.0 mg/mL aralığında belirlemişler, FRAP için ise 47.7-52.5 mM Fe(II)/g hidrolizat değerine ulaşmışlardır. Lu ve ark. (2019) ve Chatterjee ve ark. (2015)'in susam protein izolatından farklı antioksidan aktivite gösteren biyoaktif peptitler elde etmiş olmaları Lu ve ark. (2019)'ın ikili enzim sistemi kullanması ile açıklanmıştır. İkili enzim sisteminin kullanımı ile daha iyi hidroliz derecesine ulaşılması, düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin oluşumunu ve yüksek antioksidan aktiviteyi sağlamıştır (Lu ve ark., 2019). Gerçekleştirilen tez çalışmasında elde edilen biyoaktif peptitlerin yüksek antioksidan özellik göstermeleri alkalaz ve flavourzyme enzimlerinin karışım olarak kullanılmasının ardından pepsin enziminin de uygulanmış olması ile açıklanabilir.

Çizelge 4.10. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin antioksidan aktiviteleri

Örnek	IC ₅₀			FRAP (µg Trolox/mL)
	DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)	Hidroksil Serbest Radikal (µg/mL)	
Biyoaktif Peptit	7.97 (±0.22)	15.82 (±0.22)	9.15 (±0.14)	1855.21 (±37.56)
Hidrolizat	16.69 (±0.00)	34.81 (±0.01)	17.57 (±0.04)	704.58 (±11.79)

4.4.2 Şelatlama aktivitesi

Kalsiyum, çinko, demir ve bakır gibi iki değerlikli mineraller çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir. Örneğin, insan vücudunda en fazla bulunan kalsiyum toplam vücut ağırlığının %1.5–2.2'sini oluşturur (Daengprok ve ark., 2003). Ayrıca kalsiyum, hücre içi metabolizma, kemik büyümesi, kan pıhtılaşması, sinir iletimi, kas kasılması ve kalp fonksiyonu için önemlidir (Bass ve Chan, 2006). Çinko, çok sayıda enzimin katalitik bileşeni olup birçok protein, peptit, hormon, transkripsiyon ve büyüme faktörü ile sitokinlerde yapısal ve biyolojik bir rol oynar (Bozalioğlu ve ark., 2005). Demir, hemoglobindeki oksijen taşınımından sorumludur (Tay ve ark., 2011). Bakır, çeşitli enzimler için koenzim olarak önemli bir rol oynar (Megías ve ark., 2007). Minerallerin vücut için önemi düşünüldüğünde, metal şelatlayıcıların günümüzde doğal kaynaklardan alınması popüler bir konu haline gelmiştir ve bu kaynaklardan biri de biyoaktif peptitlerdir. Tez çalışmasında şelatlama aktivitesi için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir. Biyoaktif peptitlerin metal şelatlama aktivitesinin hidrolizatlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük IC_{50} değerine sahip olan fesleğen tohumu protein izolatlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin şelatlama ajanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Literatürde, çeşitli bitkisel protein kaynaklarından elde edilen mineral şelatlayıcı peptitler rapor edilmiştir. Bamdad ve Chen (2013) arpa protein hidrolizatını ultrafiltrasyon işlemiyle çeşitli fraksiyonlara ayırmışlardır (10, 5 ve 1 kDa). Molekül ağırlığı 1 kDa'dan daha küçük peptitlerin ($IC_{50} = 1.4$ mg/ml), 5 kDa–10 kDa aralığındaki peptitlere göre ($IC_{50} = 0.54$ mg/ml) daha yüksek Fe^{2+} şelatlama aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Yerfıstığı proteini hidrolizatından ultrafiltrasyon ile elde edilen <3 kDa fraksiyonların Zn^{2+} şelatlama aktivitesinin (%53), 3-5 kDa fraksiyon (%42), >5 kDa fraksiyon (%45) ve ultrafiltrasyon işlemi uygulanmamış hidrolizatlara (%50) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2020b). Chen ve ark. (2022) siyah fasulye protein hidrolizatları ve biyoaktif peptit fraksiyonlarının şelatlama aktivitelerini incelemişler ve 3-10 kDa fraksiyonların 46.85 μ g/mL IC_{50} değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, siyah fasulye protein hidrolizatının (>10 kDa) şelatlama aktivitesi için ~390 μ g/mL IC_{50} değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. 3–10 kDa peptitleri için gözlemlenen yüksek şelatlama aktivitesinin, biyoaktif peptitlerin histidin gibi hidrofilik amino asitler açısından zengin olmalarına bağlı olarak metal

iyonlarını tutma yeteneğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2022). Şelatlama aktivitesine sahip biyoaktif peptitler ayrıca susam (Wang, et al., 2012), nohut (Megías ve ark., 2007; Torres-Fuentes ve ark., 2015) ve ayçiçeği (Megías ve ark., 2008) gibi bitkisel kaynaklardan da elde edilmiştir.

Çizelge 4.11. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin şelatlama aktiviteleri

Örnek	IC ₅₀
	Şelatlama aktivitesi (mg/mL)
Biyoaktif Peptit	4.85 (±0.04)
Hidrolizat	8.51 (±0.05)

4.4.3 Anti-hipertansif aktivite

Fesleğen tohumu protein izolatından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktiviteleri Çizelge 4.12’de verilmiştir. Biyoaktif peptitlerin, ACE inhibisyonunda hidrolizatlara göre daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12). Literatürde farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen peptitlerin ACE inhibitör etkisi sergilediği belirlenmiş ve ACE inhibisyon değerlerinin peptit kaynağına, hidroliz şekline ve peptitlerin molekül ağırlığına bağlı olduğu ifade edilmiştir. Sompinit ve ark. (2019) zerdeçal ve zencefil proteinlerinden tripsin ve pepsin kullanılarak elde ettikleri hidrolizatların yüksek ACE inhibitörü (IC₅₀ = 0.4-1.8 µg/mL) olarak etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Kheeree ve ark. (2020) limon fesleğeni tohumlarından alkalaz kullanarak ultrafiltrasyon ve HPLC işlemleri ile 879 ve 639 Da moleküler ağırlığa ve anti-hipertansif aktiviteye sahip biyoaktif peptitler elde etmişlerdir. 879 ve 639 Da moleküler ağırlığa sahip biyoaktif peptitler için anti-hipertansif aktiviteye ait IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.124 ve 0.013 mM olarak tespit edilmiştir. Limon fesleğeni tohumlarının, fonksiyonel gıdalarda terapötik ve ticari faydalar sunabilen anti-hipertansif peptitlerin üretimi için yararlı bir hammadde olabileceği öne sürülmüştür (Kheeree ve ark. 2020). Hanafi ve ark. (2018) alkalaz, papain, flavourzyme ve bromelain enzimleri ile elde ettikleri yeşil soya fasulyesi hidrolizatlarının, sırasıyla 0.14, 0.20, 1.14 ve 0.36 mg/mL IC₅₀ değerleri ile ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Famuwagun ve ark. (2021) kimotripsin hidrolizi ile üretilen *Solanum makrokarpon* yaprak protein hidrolizatından

ultrafiltrasyon işlemi ile elde ettikleri peptit fraksiyonlarının, fraksiyonlanmamış hidrolizattan ($IC_{50} = 2.1$ mg/mL) daha güçlü bir ACE inhibisyonu ($IC_{50} = 0.81-0.84$ mg/mL) gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada, daha küçük boyutlu peptitlerin ACE'ye karşı daha iyi afiniteye ve inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmüştür. Mune ve ark. (2018) Bambara fasulyesi proteinlerinden alkalaz, tripsin ve termolisin enzimleri ile elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerini incelemişler, alkalaz kullanılarak hidrolize edilen proteinlere ait biyoaktif peptitlerin 52 µg/mL IC_{50} değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bhadkaria ve ark. (2023) fasulye (*Vigna aconitifolia* (Jacq.)) tohumu protein izolatından alkalaz kullanarak biyoaktif peptit üretimi gerçekleştirmişler ve <3 kDa peptit fraksiyonunun anti-hipertansif aktivitesi (ACE inhibisyon) için 9.51 µg/mL IC_{50} değeri bildirmişlerdir. Torruco-Uco ve ark. (2009) fasulye protein izolatından alkalaz ve flavourzyme kullanarak anti-hipertansif aktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin üretimini gerçekleştirmişler ve ACE inhibisyon için IC_{50} değerlerini 56-127 µg/mL aralığında tespit etmişlerdir. Segura-Campos ve ark. (2011) börülce protein izolatından flavourzyme kullanılarak elde edilen biyoaktif peptitlerde en yüksek anti-hipertansif aktiviteyi <1 kDa molekül ağırlıklı biyoaktif peptitler için tespit etmişler ve bu fraksiyon için ACE inhibisyon IC_{50} değerini 0.04 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Zhu ve ark. (2010) kayısı çekirdeği proteinlerinden elde ettikleri biyoaktif peptitlerin (<1 kDa) ACE inhibisyonu için 0.15 mg/mL IC_{50} , ultrafiltrasyon işlemi kullanılmadan analiz edilen hidrolizat için ise 0.378 mg/mL IC_{50} değeri tespit etmişlerdir. Benzer şekilde gerçekleştirilen tez çalışmasında ultrafiltrasyon işleminin anti-hipertansif aktiviteyi artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.12). Hidrolizatların ultrafiltrasyon işlemi ile daha küçük moleküler ağırlığa sahip fraksiyonlara ayrılması sonucunda bu fraksiyonların anti-hipertansif aktivitesinin hidrolizatlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2010; Segura-Campos ve ark., 2011).

Çizelge 4.12. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin anti-hipertansif aktiviteleri

Örnek	IC ₅₀
	Anti-hipertansif aktivite (mg/mL)
Biyoaktif Peptit	4.31 (±0.09)
Hidrolizat	5.45 (±0.01)

4.4.4 Anti-diyabetik aktivite

Fesleğen tohumu protein izolatından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktiviteleri Çizelge 4.13'te verilmiştir. Biyoaktif peptitlerin α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerinin inhibisyonunda daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu enzimlerin inhibisyonu kan şekerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve biyoaktif peptitlerin diyabet yönetiminde potansiyel faydalarını ortaya koyar. Literatürde farklı bitkisel proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktivite sergilediği bildirilmiştir. Vilcacundo ve ark. (2017) kinoa proteinlerinden elde ettikleri biyoaktif peptitlerin α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyonu için sırasıyla 0.32 ve 1.45 mg/mL IC₅₀ değerlerine ulaşıldığını bildirmişlerdir. Kamal ve ark. (2021) bromelain, kimotripsin ve pronaz E kullanılarak amarant protein hidrolizatları elde etmişler, en yüksek anti-diyabetik etkinin bromelain hidrolizatları ile sağlandığını bildirmişlerdir. Farklı sürelerde bromelain ile hidroliz edilen amarant proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin α -glukosidaz inhibisyonu için 1.17-1.51 mg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Kamal ve ark., 2021). Bhadkaria ve ark. (2023) fasulye (*Vigna aconitifolia* (Jacq.)) tohumu protein izolatından elde ettikleri biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişler, α -amilaz inhibisyonu için 127 μ g/mL, α -glukosidaz için 122 μ g/mL IC₅₀ değeri tespit etmişlerdir. *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinin bir peptit fraksiyonu (<1 kDa), %76'lık bir α -glukosidaz inhibisyonu sergilemiştir (Oseguera-Toledo ve ark., 2015). Mudgil ve ark. (2023) keten ve çiya tohumu proteinlerinden alkalaz, bromelain ve papain kullanarak elde ettikleri protein hidrolizatları için yüksek α -glukosidaz inhibitör etkisi bildirmişlerdir. Çiya ve keten tohumu proteinlerinden 6 saat süre sonunda elde edilen papain hidrolizatlarının sırasıyla 264 ve 562 μ g/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Mudgil ve ark., 2023). Awosika ve Aluko (2019) sarı bezelye protein

hidrolizatına uygulanan ultrafiltrasyon işleminin, hem α -amilaz hem de α -glukosidaz enzimlerine karşı inhibitör özelliklere sahip fraksiyonlara ayrılmasını sağladığı bildirilmiştir. Siow ve ark. (2017) kimyon tohumlarından üç farklı α -amilaz inhibitör özellikli peptit izole etmişler ve bu peptitlerin α -amilaz inhibisyonu için IC₅₀ değerlerini 1.58 ve 5.60 mg/mL aralığında belirlemişlerdir. Admassu ve ark. (2018) Viscozyme® L enzimi ile ön işlem uygulanan kırmızı deniz yosunlarından (*Porphyra* spp.) elde edilen proteinlerden alkalaz, nötraz, pepsin ve tripsin kullanarak anti-diyabetik aktiviteye sahip peptitler üretmişler ve en düşük IC₅₀ değerini 2.62 mM olarak tespit etmişlerdir. Ngoh ve ark. (2017) fasulye protein izolatından Protamex kullanılarak elde ettikleri α -amilaz inhibitör peptitlerinin 0.31 mM IC₅₀ değeri ile yüksek α -amilaz inhibitör aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir (Ngoh ve ark., 2017).

Çizelge 4.13. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin anti-diyabetik aktiviteleri

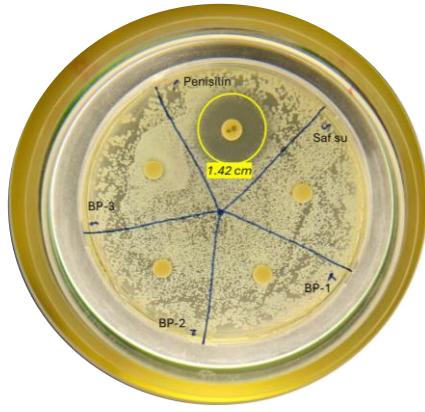
Örnek	IC ₅₀	
	α -amilaz (mg/mL)	α -glukosidaz (mg/mL)
Biyoaktif Peptit	3.91 ($\pm$ 0.03)	4.84 ($\pm$ 0.02)
Hidrolizat	7.59 ($\pm$ 0.01)	15.61 ($\pm$ 0.01)

4.4.5 Antimikrobiyal aktivite

Fesleğen tohumu protein izolatından elde edilen biyoaktif peptit örnekleri için elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan penisilinin beş farklı mikroorganizmaya (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*) antimikrobiyal etkisi olduğu görülmüştür (zon çapı >1 cm). Negatif kontrol olarak saf su kullanıldığında herhangi bir zon oluşmamıştır. Optimum koşulda elde edilen biyoaktif peptit örneklerinin *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal aktivitesine rastlanmazken, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Biyoaktif peptit örneklerinin zon çapları *L. monocytogenes* için 1.72-1.94 cm, *S. aureus* için 1.03-1.15 cm olarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinin bakterilerin morfolojik yapıları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gram negatif olan *E. coli* ve *S. Typhimurium* üzerinde

antimikrobiyal aktivite gözlenmezken, Gram pozitif olan *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivite sağlanmıştır. Gram-pozitif bakteriler, esas olarak peptidoglikanlardan oluşan kalın bir hücre duvarına sahipken, Gram-negatif bakteriler, peptidoglikanlardan oluşan ince bir hücre duvarı ile lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve fosfolipidler içeren bir dış hücre zarına sahiptir. Gram-negatif bakterilerin enzimlere, hidrofobik moleküllere ve antibiyotiklere karşı direnci dış zarın özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Ray ve Bhunia, 2007). Gram-negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkarit tabakasının küçük antimikrobiyal moleküllerin geçişine karşı, Gram-pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasından daha dirençli olduğu ifade edilmektedir (Rai ve ark., 2017). Arulrajah ve ark. (2020) kenaf tohumu proteinlerinden *L. casei* ve *L. pentosus* kullanarak fermentasyonu yolu elde ettikleri biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal özelliklerini inceledikleri çalışmada, biyoaktif peptitlerin Gram-pozitif (*Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) ve Gram-negatif (*V. parahaemolyticus*, *E. coli* ve *S. Typhimurium*) bakteriler üzerinde <%94 oranında antibakteriyel etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Song ve ark. (2020) pamuk tohumu proteininden alkalaz kullanılarak elde ettikleri biyoaktif peptitlerin (1-4 mg/mL konsantrasyon aralığı) *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *Streptococcus* üzerindeki antibakteriyel etkilerini incelemiş, artan peptit konsantrasyonlarında inhibisyon zon çapının da arttığını, 4 mg/mL peptit konsantrasyonunda en büyük zon çapının *S. aureus* için elde edildiğini bildirmişlerdir.

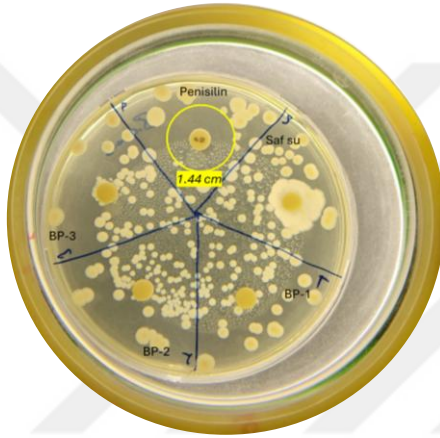
B. cereus gram pozitif bir bakteri olmasına rağmen endospor oluşturmaktadır. Endosporlu bir bakteri olan *B. cereus* antimikrobiyal ajanlara karşı endospor üretmeyen bakterilere göre daha dirençlidir (Anumudu ve ark., 2021). Bu nedenle fesleğen tohumundan elde edilen biyoaktif peptitlerin *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı düşünülmektedir.



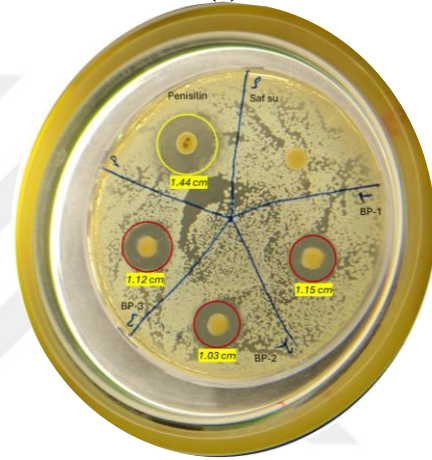
(a)



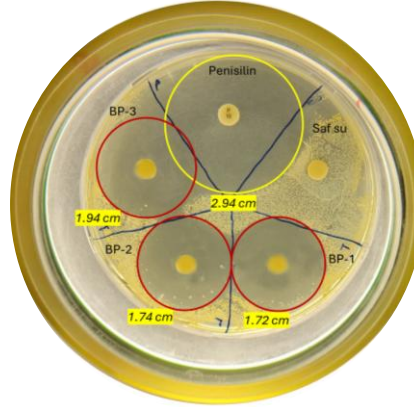
(b)



(c)



(d)



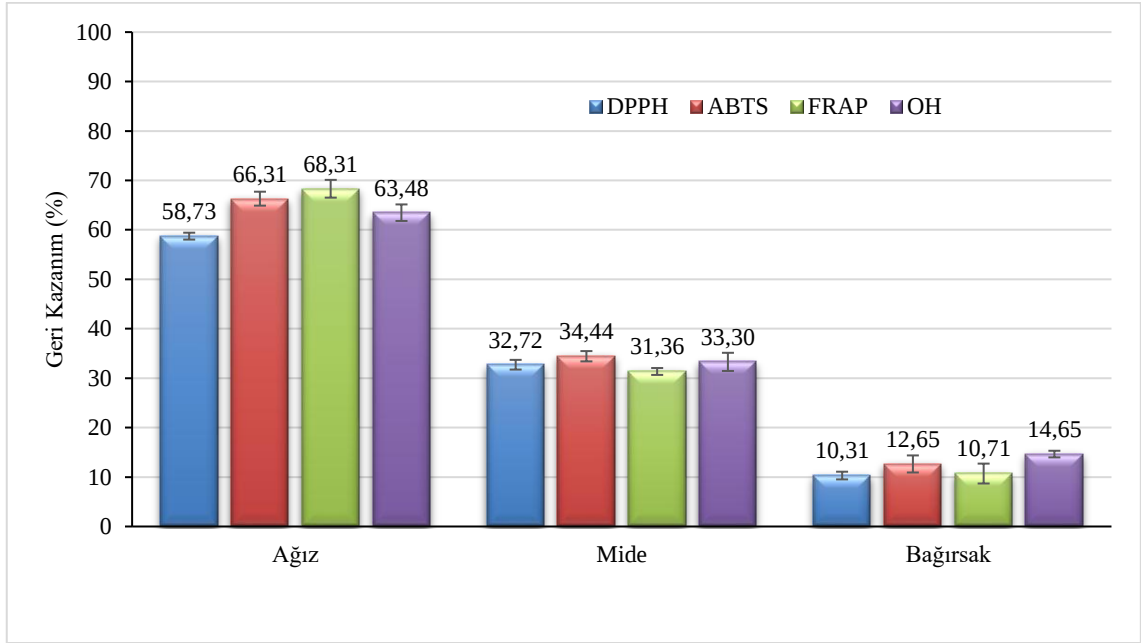
(e)

Şekil 4.8. Fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin antimikrobiyal aktiviteleri (a) *E. coli*, (b) *S. Typhimurium*, (c) *B. cereus*, (d) *S. aureus* ve (e) *L. monocytogenes*

4.4.6 Biyoaktif peptitlerin gastrointestinal sistem (GİS) stabiliteleri

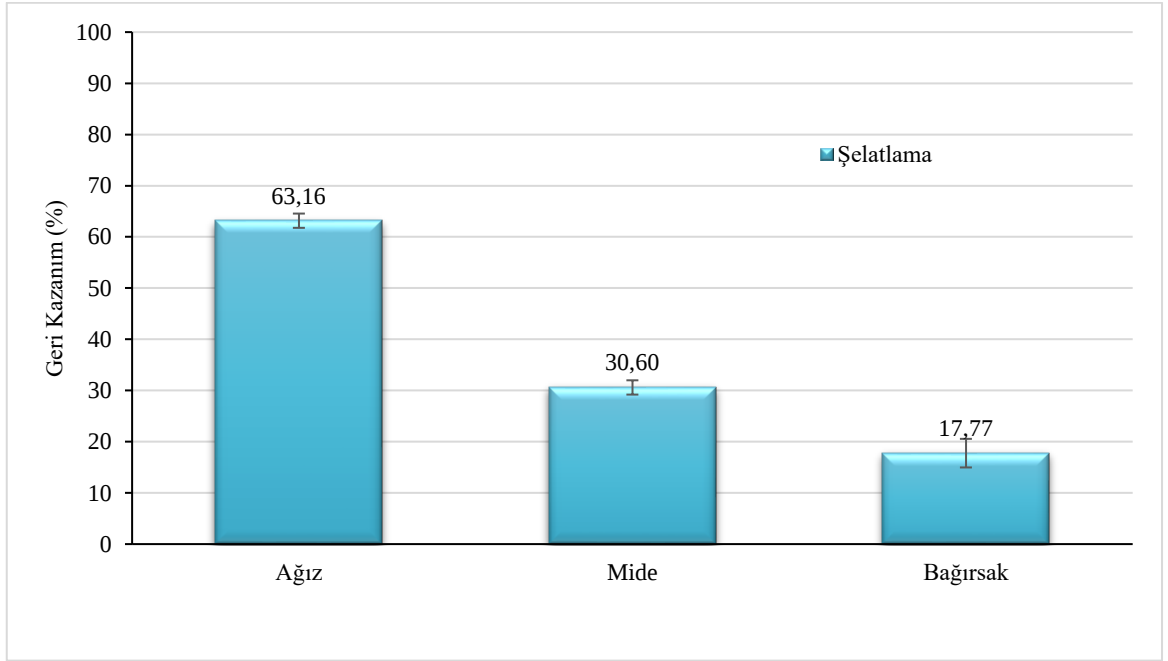
Biyoaktif peptitler, biyo-fonksiyonelliklerini sergilemeden önce hem fizyolojik seviyede hem de gıdalar içinde yapısal bütünlüklerini koruma gibi bazı zorluklarla karşı karşıya kalmaktadır. Bazı çalışmalar, özellikle di- ve tri-peptitlerin, bağırsak membranından geçerek nanomolar veya hatta pikomolar konsantrasyonlarda sistemik dolaşıma ulaştığını bildirmektedir. Genel olarak, biyoaktif peptitlerin oral yolla alındığında ve gastrointestinal sindirime maruz kaldığında özellikle mide, pankreas ve ince bağırsak membran enzimleri ve mide asidik koşulları nedeniyle biyoyararlılıkları engellenebilir (Aguilar-Toalá ve ark., 2022). Fesleğen tohumu protein izolatından optimum koşullarda elde edilen biyoaktif peptitlerin (<10 kDa fraksiyon) gastrointestinal sistem (GİS) stabiliteleri, ağız, mide ve bağırsak olarak simüle edilmiş ortamlardaki biyoaktif özelliklerinin geri kazanımları kullanılarak ortaya konmuştur. Antioksidan aktivite, şelatlama aktivitesi, anti-hipertansif aktivite ve anti-diyabetik aktivite için GİS stabiliteleri, ilgili analizlerin ağız, mide ve bağırsak ortamlarından inkübasyon süreleri sonunda örnek alınarak gerçekleştirilmesi ve kalan aktivitenin belirlenmesi ile ortaya konmuştur. Tüm fonksiyonel özellikler için geri kazanım değerlerinin yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan aktivite için GİS sonuçları Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Sonuçlara göre, ağız safhasında farklı analizler ile gerçekleştirilen antioksidan aktivitenin %58.73-68.31 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Buna karşın üç farklı antioksidan aktivite analizinde mide safhasında geri kazanım oranının %31.36-34.44 düzeylerine gerilediği tespit edilmiştir. Bağırsak safhasında ise geri kazanım oranı %10.31-14.65 seviyelerine kadar azalmıştır (Şekil 4.9). Wang ve ark. (2015) ticari serin-metiyonin biyoaktif peptiti için *in vitro* koşullarda gastrointestinal sindirim sonrasında antioksidan aktivitenin ~%16 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Bu durumun, yüksek antioksidan aktiviteye sahip bir fragmentin sindirim sonrasında yapıdan ayrılması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2015). Karlığa (2020) selenyum ile zenginleştirilmiş *S. platensis*’den elde edilen biyoaktif peptitlerin *in vitro* koşullarda gastrointestinal sindirim sistemindeki biyoyararlılığını incelemiş, DPPH ve ABTS analizleri ile belirlenen antioksidan aktivitenin ağız, mide ve bağırsak safhalarından sonra ~%95 oranında azaldığını bildirmiştir.



Şekil 4.9. Biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivitelerinin *in vitro* koşullarda GİS stabiliteleeri

Şelatlama aktivitesi için elde edilen GİS sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Antioksidan aktiviteye benzer şekilde, fesleğen tohumlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitelerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında ~%80 oranında azaldığı belirlenmiştir. Literatürde tez çalışmasında elde edilen verilere ilişkin benzer çalışmalar bulunmasa da biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitesinin gastrointestinal sistemde azalabileceği bildirilmiştir (Yu ve ark., 2023).



Şekil 4.10. Biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitelerinin *in vitro* koşullarda GİS stabiliteleri

Anti-hipertansif aktivite için elde edilen GİS sonuçları Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Fesleğen tohumlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerinin *in vitro* gastrointestinal sindirimde ağız safhasında ~%80 oranında korunmasına karşın, son safha olan bağırsak safhasında aktivitenin ~%86’sının kaybedildiği belirlenmiştir. Tavares ve ark (2011) peynir altı suyu protein izolatlarından elde ettikleri biyoaktif peptitlerde *in vitro* gastrointestinal sindirim sonucunda ACE inhibisyon aktivitesi IC_{50} değerinin 253.6 $\mu\text{g/mL}$ ’den 336.3 $\mu\text{g/mL}$ değerine ulaştığını bildirmişlerdir. Mide ve bağırsak fazındaki sindirim enzimlerinin ACE enzimi inhibisyonu oluşturan peptitlerin kısmi parçalanmasına yol açtığı ve bu nedenle ACE inhibisyon aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir (Tavares ve ark., 2011). Benzer şekilde, Miguel ve ark. (2006) ovalbuminden elde edilen biyoaktif peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesinin *in vitro* gastrointestinal sindirimin mide ve bağırsak safhalarında önemli oranda azaldığını, bu durumun ACE inhibitörü peptitlerin uç kısımlarından parçalanması sonucunda ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

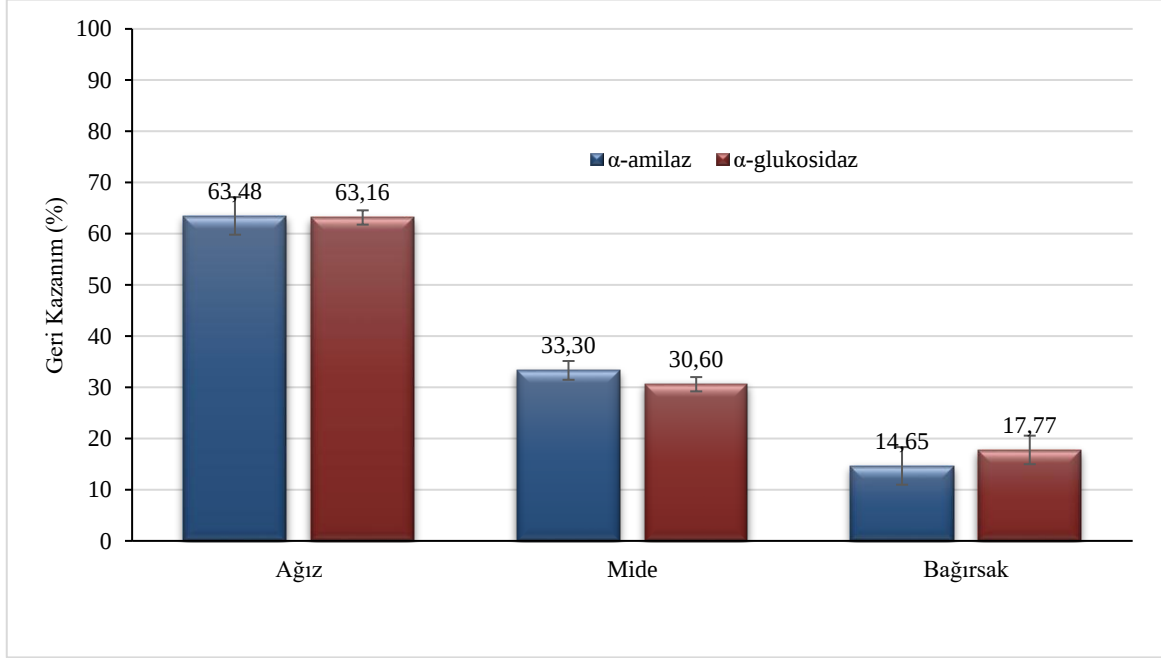
Megías ve ark. (2009) ayçiçeği proteininden alkalaz kullanarak ürettikleri biyoaktif peptitler için *in vitro* gastrointestinal sindirim stabilite çalışması gerçekleştirmişlerdir. Yalnızca mide sıvısında 1 saat bekletilen peptitlerin ACE inhibisyon değerinde değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşın, aşamalı olarak mide sıvısında 1 saat ve bağırsak sıvısında 1 saat bekletilen peptitlerin IC₅₀ değerinin 20.4 µg/mL'den 50.0 µg/mL'ye arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, aşamalı olarak mide sıvısında 1 saat ve bağırsak sıvısında 3 saat bekletilen peptitlerin IC₅₀ değerinin 20.4 µg/mL'den 68.2 µg/mL'ye yükseldiği gözlenmiştir. Ayçiçeği proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin bağırsak sıvısında bekletilmesi ile ACE inhibisyon aktivitesinin önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (Megías ve ark., 2009).



Şekil 4.11. Biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerinin *in vitro* koşullarda GİS stabiliteeleri

α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri kullanılarak tespit edilen anti-diyabetik aktivite için elde edilen GİS sonuçları Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Fesleğen tohumlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktivitelerinin α -amilaz ve α -glukosidaz için benzer sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). Literatürde doğrudan anti-diyabetik aktivitenin *in vitro* sindirim koşullarında GİS stabiliteelerinin belirlendiği bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Ancak diğer özelliklerde olduğu gibi anti-diyabetik aktiviteye sahip peptitlerin kısmi parçalanmasının geri kazanım oranını düşürdüğü tahmin edilmektedir.



Şekil 4.12. Biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktivitelerinin *in vitro* koşullarda GİS stabiliteleeri

5. SONUÇ

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, fesleğen tohumundan proteinlerin ekstraksiyonu amacıyla enzimatik ön işlemin ardından klasik alkali ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işlemleri uygulanmıştır. Enzimatik ön işlem için deneysel bir tasarım oluşturulmuş ve oluşturulan tasarıma göre enzim uygulamasının ardından ekstraksiyon işlemleri klasik alkali ekstraksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlem için pH, sıcaklık, enzim miktarı ve işlem süresi bağımsız değişkenler, protein verimi ve indirgen şeker içeriği ise bağımlı değişkenler olarak tanımlanmış ve en yüksek protein verimi ve indirgen şeker miktarını sağlayan koşullar belirlenmiştir. Ayrıca, optimum koşullarda gerçekleştirilen enzimatik ön işlemin ardından örnekler UDE işlemi uygulanmıştır. Böylelikle tez çalışmasında, enzimatik ön işlem uygulanmamış ve klasik alkali ekstraksiyon ile elde edilen kontrol (K) örneği, optimum enzimatik ön işlem koşullarında klasik ekstraksiyon ile elde edilen E+KE örneği ve optimum enzimatik ön işlem koşullarında UDE işlemi ile elde edilen E+UDE örneği olmak üzere üç farklı protein izolatu elde edilmiştir. Protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük özellikleri, emülsifikasyon özellikleri ve çözünürlük özellikleri belirlenerek karakterizasyonları sağlanmıştır. Ayrıca üç farklı protein izolatının yapısal ve termal özellikleri ile molekül ağırlıkları tespit edilmiş, E+UDE örneklerinin amino asit profili belirlenmiştir.

Enzimatik ön işlemin optimizasyonu için pH 3.0-5.0, sıcaklık 35-50°C, enzim miktarı 0.5-5.0 FBGU/g tohum ve işlem süresi 1-4 saat bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve en yüksek protein verimi ve indirgen şeker miktarını sağlayan koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon işlemi sonucunda en yüksek protein verimi ve indirgen şeker miktarı pH 3.01, sıcaklık 52.11°C, enzim miktarı 3.75 FBGU/g tohum ve süre 3.70 saat koşullarında tespit edilmiştir. Bu koşullarda, protein verimi %86.55 ve indirgen şeker miktarı 164.63 mg glukoz/g tohum olarak tahminlenmiştir. Doğrulama testleri sonuçlarına göre deneysel verilerin istatistiksel olarak tahminlenen değerlerden farklı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Fesleğen tohumundan elde edilen üç farklı protein izolatının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol, E+KE ve E+UDE örneklerinin koagüle protein yüzdeleri

sırasıyla %3.9, %5.4 ve %7.0 olarak belirlenmiştir. UDE işleminin koagüle protein yüzdesini belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Köpük kapasitesi kontrol örneği için %63, E+KE örneği için %69, E+UDE örneği için %71 olarak belirlenmiştir. En düşük köpük kapasitesi değeri kontrol örneğinde tespit edilmiştir. Köpük stabilitesi ise kontrol örneği için %56, E+KE örneği için %57, E+UDE örneği için %59 olarak belirlenmiştir. En yüksek köpük stabilitesine sahip örneğin E+UDE olduğu bulgulanmıştır. Kontrol, E+KE ve E+UDE örneklerinin su tutma kapasiteleri sırasıyla 3.6, 5.0, 5.2 ve yağ tutma kapasiteleri sırasıyla 3.1, 3.7, 3.8 g/g olarak tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon ve enzimatik işlemin fesleğen tohumu protein izolatlarının su ve yağ tutma kapasitesini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Kontrol, E+KE ve E+UDE örneklerinin emülsiyon stabiliteleri sırasıyla 29.6, 31.1 ve 33.0 dakika, emülsiyon kapasiteleri %54.4, %63.3 ve %67.8, emülsiyon aktiviteleri ise 76.8, 77.5 ve 80.0 m²/g olarak tespit edilmiştir. Emülsifikasyon özellikleri açısından en düşük özellikler kontrol örneğinde, en yüksek özellikler E+UDE örneğinde belirlenmiştir.

Fesleğen tohumu protein izolatlarının farklı pH koşullarında çözünürlükleri belirlenmiştir. En düşük protein çözünürlüğünün pH 4.0'da olduğu belirlenmiş, bu nokta fesleğen tohumu proteinleri için izoelektrik nokta olarak tespit edilmiştir. En yüksek protein çözünürlüğünün ise pH 12.0'de olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneğinde tüm pH değerleri için en düşük protein çözünürlüğü gözlemlenmiştir. E+UDE örneğinde en yüksek protein çözünürlükleri gözlemlenmiştir. Her örnek için pH 4.0'dan pH 8.0'a kadar hızlı bir artış gözlenmiş, pH 8.0'dan pH 12.0'a kadar daha yavaş bir artış olduğu belirlenmiştir. Enzimatik ön işlem ve UDE'nin protein çözünürlüğünü arttırdığı belirlenmiştir.

Fesleğen tohumu protein izolatlarının moleküler ağırlıkları SDS-PAGE ve yapısal özellikleri FT-IR analizleri ile belirlenmiştir. SDS-PAGE sonuçları, protein izolatlarının moleküler ağırlıklarının ~22 kDa ile ~82 kDa arasında değiştiğini göstermiştir. Yapısal analizler, proteinlerin ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak belirgin farklılıklar göstermediğini ve ultrasonikasyon işleminin protein yapısını önemli ölçüde değiştirmediğini ortaya koymuştur. FT-IR analizleri, tüm protein izolatları için Amid I, Amid II ve Amid III bantlarının varlığını doğrulamıştır. Protein izolatlarının ikincil yapıları arasında en yüksek orana sahip olan yapı β -tabaka (kontrol, E+KE ve E+UDE

örnekleri için sırasıyla %40.7, %42.9 ve %43.7) olarak tespit edilmiştir. Denatürasyon sıcaklıkları kontrol, E+KE ve E+UDE örnekleri için sırasıyla 98.42, 164.98 ve 209.60°C, denatürasyon entalpi değerleri (ΔH_d) ise kontrol, E+KE ve E+UDE örnekleri için sırasıyla 133 J/g, 105.89 J/g ve 47.53 J/g olarak belirlenmiştir.

Fesleğen tohumundan enzimatik ön işlem ve UDE ile elde edilen protein izolatlarının amino asit kompozisyonu belirlenmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatının toplam esansiyel amino asit miktarı 327.51 g amino asit/kg protein izolatu olarak tespit edilmiştir. E+UDE örneklerinin esansiyel amino asitlerden lösin (70 g amino asit /kg protein izolatu) ve lizin (56 g amino asit /kg protein izolatu), esansiyel olmayan amino asitlerden ise arjinin (64 g amino asit /kg protein izolatu) ve glutamik asit (82 g amino asit /kg protein izolatu) açısından zengin olduğu belirlenmiştir. E+UDE örneklerinin sülfür içeren amino asitleri ise düşük oranda içerdiği tespit edilmiştir (24 g amino asit /kg protein izolatu). Hidrofobik amino asitlerin fazla miktarda bulunması (331 g amino asit /kg protein izolatu) protein izolatlarının yüksek ısıl stabiliteye sahip olabileceğini ortaya koymuştur.

E+UDE örneklerinden enzimatik hidrolizle biyoaktif peptit üretiminin optimizasyonu için bağımsız değişkenler enzim:substrat oranı 0.5-15%, alkalaz:flavourzyme oranı 0.5-1.0 U/U ve hidroliz süresi 60-150 dakika olarak seçilmiştir. En yüksek hidroliz derecesi ve en yüksek DPPH inhibisyonunu sağlayan koşullar optimizasyon işlemi ile belirlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda optimum koşullar enzim:substrat oranı %12.26, alkalaz:flavourzyme oranı 0.63 U/U ve hidroliz süresi 157.33 dakika olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşul için tahminlenen hidroliz derecesi %73.73 ve DPPH inhibisyonu %41.23 olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda üç tekrarlı doğrulama denemeleri yapılmış ve tahminlenen ve deneysel değerlerin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Hidroliz süresinin genel olarak düşük olduğu durumlarda daha düşük hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu elde edilmiş, sürenin arttığı durumlarda daha fazla hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu gözlemlenmiştir. Alkalaz:flavourzyme oranı hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonunu önemli oranda etkilemiş, genel olarak enzimlerin aynı miktardaki karışımı en yüksek hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu sağlamıştır. Enzim:substrat oranı arttıkça hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonunun da arttığı gözlemlenmiştir. Enzim:substrat oranının %0.5 olduğu durumlarda en düşük hidroliz derecesi ve DPPH inhibisyonu belirlenmiştir.

Fesleğen tohumu protein izolatlarından elde edilen biyoaktif peptitler antioksidan, şelatlama, anti-hipertansif ve anti-diyabetik aktiviteler açısından önemli sonuçlar göstermiştir. Fesleğen tohumu protein izolatlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin DPPH, ABTS ve hidroksil serbest radikal için IC₅₀ değerleri sırasıyla 8.0, 15.8 ve 9.15 µg/mL, FRAP ile belirlenen antioksidan aktivite değeri ise 1855 µg Trolox/mL olarak tespit edilmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitesi için IC₅₀ değeri ise 4.9 mg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitesi için IC₅₀ değeri 4.3 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ultrafiltrasyon işleminin hidrolizatı düşük moleküler ağırlıklı fraksiyona ayırması sonucunda, anti-hipertansif aktivitenin önemli oranda arttığı bulgulanmıştır. Biyoaktif peptitlerin α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerinin inhibisyonunda düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu (3.9 mg/mL ve 4.8 mg/mL) belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, fesleğen tohumu biyoaktif peptitlerinin diyabet yönetiminde kullanılma potansiyelini ortaya koymuştur.

Fesleğen tohumu protein izolatından elde edilen biyoaktif peptit örnekleri için elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre, *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye rastlanmazken, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Biyoaktif peptit örneklerinin zon çapları *L. monocytogenes* için 1.72-1.94 cm, *S. aureus* için 1.03-1.15 cm olarak belirlenmiştir. Fesleğen tohumu protein izolatı biyoaktif peptitleri Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkinlik gösterirken, Gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olmamıştır.

Fesleğen tohumu protein izolatından elde edilen biyoaktif peptitlerin antioksidan aktivite, şelatlama aktivitesi, anti-hipertansif aktivite ve anti-diyabetik aktivite için GİS stabiliteleri tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite için ağız safhasında farklı analizler ile gerçekleştirilen antioksidan aktivitenin %58.73-68.31 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Buna karşın üç farklı antioksidan aktivite analizinde mide safhasında geri kazanım oranının %31.36-34.44 düzeylerine gerilediği tespit edilmiştir. Bağırsak safhasında ise geri kazanım oranı %10.31-14.65 seviyelerine kadar azalmıştır. Biyoaktif peptitlerin şelatlama aktivitelerinin *in vitro* gastrointestinal sindirim sonrasında ~%80 oranında azaldığı belirlenmiştir. Fesleğen tohumlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-hipertansif aktivitelerinin ağız safhasında ~%80 oranında korunmasına karşın, son

safha olan bağırsak safhasında aktivitenin ~%86'sının kaybedildiği belirlenmiştir. Fesleğen tohumlarından elde edilen biyoaktif peptitlerin anti-diyabetik aktiviteleri (α -amilaz ve α -glukosidaz) için GİS sonuçları, anti-diyabetik aktivitenin bağırsak safhasında %85 ve %82 oranında azaldığını göstermiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, farklı yöntemlerle izole edilen fesleğen tohumu proteinlerinin ve biyoaktif peptitlerin karakterizasyonu kapsamlı bir şekilde yapılmıştır. Fesleğen tohumu proteinlerinin ekstraksiyon koşulları araştırılmış ve farklı yöntemler ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, fesleğen tohumu protein izolatından enzimatik hidroliz işlemi ile biyoaktif peptitlerin üretimi ve elde edilen biyoaktif peptitlerin karakterizasyonu sağlanmıştır. Karakterizasyon sonuçlarına göre, fesleğen tohumu protein izolatlarının yüksek besinsel değeri ve fonksiyonel özellikleri, fesleğen tohumu protein izolatlarının gıda endüstrisinde geniş kullanım potansiyelini ortaya koymuştur. Enzimatik ve ultrasonik yöntemlerin kombinasyonu ile elde edilen protein izolatları, çeşitli gıda uygulamaları için uygun olup, farklı ticari ürünlerde besinsel kalitenin artırılmasına katkı sağlayabilecek düzeydedir. Ayrıca, fesleğen tohumu protein izolatlarından üretilen biyoaktif peptitlerin insan sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olabileceği saptanmış ve bu peptitlerin antioksidan, antimikrobiyal ve diğer biyoaktif özellikleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, fesleğen tohumu protein izolatları ile bu izolatlardan elde edilen biyoaktif peptitlerin gıda endüstrisinde yenilikçi ürünlerde geniş bir kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışması, gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutabilecek nitelikte olup, fesleğen tohumu protein izolatı ve biyoaktif peptitlerin fonksiyonel gıda uygulamaları için önemli bir temel oluşturmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Acquah, C., Di Stefano, E. ve Udenigwe, C.C., 2018. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *Journal of Food Bioactives*, 4, 88-98.
- Adachi, T., Izumi, H., Yamada, T., Tanaka, K., Takeuchi, S., Nakamura, R. ve Matsuda, T., 1993. Gene structure and expression of rice seed allergenic proteins belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor family. *Plant Molecular Biology*, 21, 239-248.
- Admassu, H., Gasmalla, M.A., Yang, R. ve Zhao, W., 2018. Identification of bioactive peptides with α -amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of red seaweed (*Porphyra spp*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (19), 4872-4882.
- Afifah, N.H.B.S.S. ve Gan, C.Y., 2016. Antioxidative and amylase inhibitor peptides from basil seeds. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22, 3-10.
- Aguilar-Toalá, J.E. ve Liceaga, A.M., 2020. Identification of chia seed (*Salvia hispanica* L.) peptides with enzyme inhibition activity towards skin-aging enzymes. *Amino Acids*, 52 (8), 1149-1159.
- Aguilar-Toalá, J.E., Quintanar-Guerrero, D., Liceaga, A.M. ve Zambrano-Zaragoza, M.L., 2022. Encapsulation of bioactive peptides: A strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *RSC Advances*, 12 (11), 6449-6458.
- Aiking, H., 2011. Future protein supply. *Trends in Food Science and Technology*, 22 (2-3), 112-120.
- Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N. ve Aluko, R.E., 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (10), 6685-6702.
- Akdeniz, V. ve Akalın, A.S., 2019. New approach for yoghurt and ice cream production: High-intensity ultrasound. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 392-398.
- Alpiger, S.B. ve Corredig, M., 2023. Changes in the physicochemical properties of rapeseed-derived protein complexes during enzyme-assisted wet milling. *Sustainable Food Proteins*, 1 (1), 16-29.
- Aluko, R.E., 2024. Polypeptide composition of major oilseed proteins and functional properties of extracted protein products: A concise review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 101 (1), 23-39.
- Angers, P., Morales, M.R. ve Simon, J.E., 1996. Fatty acid variation in seed oil among *Ocimum* species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 393-395.
- Anumudu, C., Hart, A., Miri, T. ve Onyeaka, H., 2021. Recent advances in the application of the antimicrobial peptide nisin in the inactivation of spore-forming bacteria in foods. *Molecules*, 26 (18), 5552.
- Anusha, R. ve Bindhu, O.S., 2016. Bioactive Peptides from Milk. *Milk Proteins-From Structure to Biological Properties and Health Aspects*, Ed: I. Gigli. IntechOpen, Rijeka, Croatia, 102-139.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn. AOAC International, Md., USA.

- Arif, M. ve Pauls, K.P., 2018. Properties of Plant Proteins. Plant Bioproducts, Eds: G. Chen, R.Weselake, S. Singer. Springer, New York, USA, 121-142.
- Arulrajah, B., Muhialdin, B.J., Zarei, M., Hasan, H. ve Saari, N., 2020. Lacto-fermented Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed protein as a source of bioactive peptides and their applications as natural preservatives. Food Control, 110, 106969.
- Awosika, T.O. ve 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 and Technology, 54 (6), 2021-2034.
- Badger, T.M., Ronis, M.J., Simmen, R.C. ve Simmen, F.A., 2005. Soy protein isolate and protection against cancer. Journal of the American College of Nutrition, 24 (2), 146-149.
- Badjona, A., Bradshaw, R., Millman, C., Howarth, M. ve Dubey, B., 2024. Structural, thermal, and physicochemical properties of ultrasound-assisted extraction of faba bean protein isolate (FPI). Journal of Food Engineering, 377, 112082.
- BahramParvar, M., Razavi, S.M. ve Mazaheri Tehrani, M., 2012. Optimising the ice cream formulation using basil seed gum (*Ocimum basilicum* L.) as a novel stabiliser to deliver improved processing quality. International Journal of Food Science and Technology, 47 (12), 2655-2661.
- Balandrán-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A.M., Ramos-Clamont Montfort, G. ve Huerta-Ocampo, J.Á., 2019. Plant-Based Proteins. Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications, Ed: C.M. Galanakis. Academic Press, London, United Kingdom, 97-130.
- Bamdad, F. ve Chen, L., 2013. Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures. Molecular Nutrition and Food Research, 57 (3), 493-503.
- Barrera, E.S., Martínez-Flores, H.E., Garnica-Romo, M.G., Penagos, C.J.C., Saavedra, J.P. ve Macazaga-Alvarez, R., 2006. Functional characteristics of protein flaxseed concentrate obtained applying a response surface methodology. Journal of Food Science, 71 (8), 495-498.
- Barth, A. ve Zscherp, C., 2002. What vibrations tell about proteins. Quarterly Reviews of Biophysics, 35 (4), 369-430.
- Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1767 (9), 1073-1101.
- Bass, J.K. ve Chan, G.M., 2006. Calcium nutrition and metabolism during infancy. Nutrition, 22 (10), 1057-1066.
- Bedin, S., Netto, F.M., Bragagnolo, N. ve Taranto, O.P., 2020. Reduction of the process time in the achieve of rice bran protein through ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction. Separation Science and Technology, 55 (2), 300-312.
- Benhammouche, T., Melo, A., Martins, Z., Faria, M.A., Pinho, S.C., Ferreira, I.M. ve Zaidi, F., 2021. Nutritional quality of protein concentrates from *Moringa Oleifera* leaves and *in vitro* digestibility. Food Chemistry, 348, 128858.

- Benzie, I.F. ve Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70-76.
- Bernardi, S., Lupatini-Menegotto, A.L., Kalschne, D.L., Moraes Flores, É.L., Bittencourt, P.R.S., Colla, E. ve Canan, C., 2021. Ultrasound: A suitable technology to improve the extraction and techno-functional properties of vegetable food proteins. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, 1-11.
- Berrazaga, I., Micard, V., Gueugneau, M. ve Walrand, S., 2019. The role of the anabolic properties of plant-versus animal-based protein sources in supporting muscle mass maintenance: A critical review. *Nutrients*, 11 (8), 1825.
- Bersuder, P., Hole, M. ve Smith, G., 1998. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (2), 181-187.
- Bhadkaria, A., Narvekar, D.T., Kanekar, S., Devasya, R.P., Srivastava, N. ve Bhagyawant, S.S., 2023. Peptide fraction from moth bean (*Vigna aconitifolia* (Jacq.)) seed protein hydrolysate demonstrates multifunctional characteristics. *Process Biochemistry*, 134 (2023), 165-174.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R. ve Kumar, V., 2020. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26 (1), 139-150.
- Bilal, A., Jahan, N., Ahmed, A., Bilal, S.N., Habib, S. ve Hajra, S., 2012. Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-A review. *International Journal of Current Research and Review*, 4 (23), 73-83.
- Bose, U., Broadbent, J.A., Byrne, K., Hasan, S., Howitt, C.A. ve Colgrave, M.L., 2019. Optimisation of protein extraction for in-depth profiling of the cereal grain proteome. *Journal of Proteomics*, 197, 23-33.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. ve Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114 (4), 1198-1205.
- Boye, J., Zare, F. ve Pletch, A., 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2), 414-431.
- Boyer, R.F. ve McCleary, C.J., 1987. Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferretin iron release. *Free Radical Biology and Medicine*, 3 (6), 389-395.
- Bozalioğlu, S., Özkan, Y., Turan, M. ve Şimşek, B., 2005. Prevalence of zinc deficiency and immune response in short-term hemodialysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18 (3), 243-249.
- Butt, M.S. ve Rizwana Batool, R.B., 2010. Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (4), 373-379.

- Calderón Bravo, H., Vera Céspedes, N., Zura-Bravo, L. ve Muñoz, L.A. 2021. Basil seeds as a novel food, source of nutrients and functional ingredients with beneficial properties: A review. *Foods*, 10 (7), 1467.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P. ve Nucara, A., 2008. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, 108 (1), 361-368.
- Castillo, I.J.B., Angelia, M.R.N., Torio, M.A.O. ve Belina-Aldemita, B.M.D., 2017. Antihypertensive property of the peptic and chymotryptic hydrolysates derived from the crude protein extract of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] seeds. *International Food Research Journal*, 24 (6), 2586-2592.
- Chai, T.T., Soo, Z.Y., Hsu, K.C., Li, J.C., Abd Manan, F. ve Wong, F.C., 2019. Antioxidant activity of Semen Cassiae protein hydrolysate: Thermal and gastrointestinal stability, peptide identification, and *in silico* analysis. *Modern Food Science and Technology*, 35 (9), 38-48.
- Chalé, F.H., Ruiz, J.C.R., Ancona, D.B., Fernández, J.J.A. ve Campos, M.R.S., 2016. The hypolipidemic effect and antithrombotic activity of *Mucuna pruriens* protein hydrolysates. *Food and Function*, 7 (1), 434-444.
- Chandran, A.S., Suri, S. ve Choudhary, P., 2023. Sustainable plant protein: an up-to-date overview of sources, extraction techniques and utilization. *Sustainable Food Technology*, 1 (4), 466-483.
- Chang, B.W., Chen, R.L., Huang, I.J. ve Chang, H.C., 2001. Assays for angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Analytical Biochemistry*, 291 (1), 84-88.
- Chatterjee, C., Gleddie, S. ve Xiao, C.W., 2018. Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients*, 10 (9), 1211.
- Chatterjee, R., Dey, T.K., Ghosh, M. ve Dhar, P., 2015. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 70-81.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. ve Lorient, D., 1985. Amino Acids, Peptides and Proteins (Chapter 5). *Food Chemistry*, Ed: O.R. Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 246-369.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. ve Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chen, J.R., Okada, T., Muramoto, K., Suetsuna, K. ve Yang, S.C., 2002. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein. *Journal of Food Biochemistry*, 26 (6), 543-554.
- Chen, Y., Zheng, Z., Ai, Z., Zhang, Y., Tan, C.P. ve Liu, Y., 2022. Exploring the antioxidant and structural properties of Black Bean protein hydrolysate and Its peptide fractions. *Frontiers in Nutrition*, 9, 884537.

- Chen, Z., Wang, J., Liu, W., ve Chen, H., 2017. Physicochemical characterization, antioxidant and anticancer activities of proteins from four legume species. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 964-972.
- Choi, J.Y., Heo, S., Bae, S., Kim, J. ve Moon, K.D., 2020. Discriminating the origin of basil seeds (*Ocimum basilicum* L.) using hyperspectral imaging analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 118, 108715.
- Dabbour, M., He, R., Ma, H. ve Musa, A., 2018. Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*, 41 (5), e12799.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naivikul, O., Pornsinlpatip, P., Issigonis, K. ve Mine, Y., 2003. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (20), 6056-6061.
- de Castro, R.J. ve Sato, H.H., 2014. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. *International Journal of Food Science and Technology*, 49 (2), 317-328.
- de Figueiredo, V.R.G., Yamashita, F., Vanzela, A.L.L., Ida, E.I. ve Kurozawa, L.E., 2018. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 1508-1517.
- De Groot, A.P. ve Slump, P., 1969. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *The Journal of Nutrition*, 98 (1), 45-56.
- de la Rosa-Millán, J., Orona-Padilla, J.L., Flores-Moreno, V.M. ve Serna-Saldívar, S.O., 2018. Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. *International Journal of Food Science and Technology*, 53 (6), 1414-1424.
- del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J.M., Espínola, F., Moya, M. ve Castro, E., 2019. Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459-477.
- Deleu, L.J., Lambrecht, M.A., Van de Vondel, J. ve Delcour, J.A., 2019. The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Current Opinion in Food Science*, 25, 98-103.
- Deng, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X. ve Li, S., 2019. Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate. *Food Chemistry*, 283, 539-548.
- Di Daniele, N., Noce, A., Vidiri, M. F., Moriconi, E., Marrone, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., D'Urso, G., Tesauro, M., Rovella, V. ve De Lorenzo, A., 2017. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*, 8 (5), 8947-8979.
- Dia, V.P. ve De Mejia, E.G., 2011. Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in

- human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55 (4), 623-634.
- Doyen, A., Beaulieu, L., Saucier, L., Pouliot, Y. ve Bazinet, L., 2011. Impact of ultrafiltration membrane material on peptide separation from a snow crab byproduct hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (5), 1784-1792.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C. ve Xie, M., 2018. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131-140.
- Dzah, C.S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J. Chen, G. ve Ma, H., 2020. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
- Embaby, H.E., Swailam, H.M. ve Rayan, A.M., 2018. Preparation and physicochemical properties of protein concentrate and isolate produced from *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. *raddiana*. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 489-495.
- Erdmann, K., Cheung, B.W. ve 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.
- Esfandi, R., Walters, M.E. ve Tsopmo, A., 2019. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*, 5 (4), e01538.
- Esteve, C., Marina, M.L. ve García, M.C., 2015. Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167, 272-280.
- Famuwagun, A.A., Alashi, A.M., Gbadamosi, S.O., Taiwo, K.A., Oyedele, D., Adebooye, O.C. ve Aluko, R.E., 2021. Effect of protease type and peptide size on the *in vitro* antioxidant, antihypertensive and anti-diabetic activities of eggplant leaf protein hydrolysates. *Foods*, 10 (5), 1112.
- FAO/WHO, 1991. Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO Paper 51, Rome.
- FAO/WHO, 2013. Dietary Protein Quality Evaluation In Human Nutrition: Report of an FAOexpert Consultation, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Auckland, New Zealand.
- Fatima, K., Imran, M., Ahmad, M.H., Khan, M.K., Khalid, W., Al-Farga, A., ve Eskandrani, A.A., 2023. Ultrasound-assisted extraction of protein from *Moringa oleifera* seeds and its impact on techno-functional properties. *Molecules*, 28(6), 2554.
- Fetzer, A., Herfellner, T., Stäbler, A., Menner, M. ve Eisner, P., 2018. Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. *Industrial Crops and Products*, 112, 236-246.

- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. ve Varidi, M.J., 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: Extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (15), 3165-3176.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. ve Varidi, M.J., 2018. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (5), 1880-1888.
- Figueroa-González, J.J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E.J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J. ve Martínez-Velasco, A., 2022. Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 153, 112561.
- Firdaous, L., Dhulster, P., Amiot, J., Gaudreau, A., Lecouturier, D., Kapel, R., Lutin, F., Vézina, L-P. ve Bazinet, L., 2009. Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 329 (1-2), 60-67.
- Gadalkar, S.M. ve Rathod, V.K., 2020. Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50 (2), 133-140.
- Gajendiran, A., Thangaraman, V., Thangamani, S., Ravi, D. ve Abraham, J., 2016. Antimicrobial, antioxidant and anticancer screening of *Ocimum basilicum* seeds. *Bulletin of Pharmaceutical Research*, 6 (3), 114-119.
- Galili, G. ve Amir, R., 2013. Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. *Plant Biotechnology Journal*, 11 (2), 211-222.
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.B., Chen, B. ve Rao, J., 2020. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045.
- Ge, J., Sun, C.X., Mata, A., Corke, H., Gan, R.Y. ve Fang, Y., 2021. Physicochemical and pH-dependent functional properties of proteins isolated from eight traditional Chinese beans. *Food Hydrocolloids*, 112, 106288.
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M. ve Aider, M., 2015. Study of the functional properties of canola protein concentrates and isolates extracted by electro-activated solutions as non-invasive extraction method. *Food Bioscience*, 12, 128-138.
- Golly, M.K., Ma, H., Yuqing, D., Dandan, L., Quaisie, J., Tuli, J.A., Mintah B.K., Dzah, C.S. ve Agordoh, P.D., 2020. Effect of multi-frequency countercurrent ultrasound treatment on extraction optimization, functional and structural properties of protein isolates from walnut (*Juglans regia* L.) meal. *Journal of Food Biochemistry*, 44 (6), e13210.

- González-García, E., Marina, M.L. ve García, M.C., 2014. Plum (*PrunusDomestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: Extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods*, 11, 428-437.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R. ve 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.
- Görgüç, A., Bircan, C. ve Yılmaz, F.M., 2019. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 283, 637-645.
- Görgüç, A., Özer, P. ve Yılmaz, F.M., 2020. Simultaneous effect of vacuum and ultrasound assisted enzymatic extraction on the recovery of plant protein and bioactive compounds from sesame bran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 87, 103424.
- Gorissen, S.H., Crombag, J.J., Senden, J.M., Waterval, W.H., Bierau, J., Verdijk, L.B. ve van Loon, L.J., 2018. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, 50, 1685-1695.
- Górska-Warsewicz, H., Laskowski, W., Kulykovets, O., Kudlińska-Chylak, A., Cieczotko, M. ve Rejman, K., 2018. Food products as sources of protein and amino acids-The case of Poland. *Nutrients*, 10 (12), 1977.
- Gouda, K.G.M., Gowda, L.R., Rao, A.A. ve Prakash, V., 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4568-4573.
- Gouseti, O., Larsen, M.E., Amin, A., Bakalis, S., Petersen, I.L., Lametsch, R. ve Jensen, P.E., 2023. Applications of enzyme technology to enhance transition to plant proteins: A Review. *Foods*, 12 (13), 2518.
- Gropper, S., Smith, J. ve Groff, J., 2018. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 7th edn. Wardsworth Cengage Learning, 640 p, USA.
- Guan, X. and Yao, H., 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106, 345-351.
- Gupta, P. ve Nayak, K.K., 2015. Characteristics of protein-based biopolymer and its application. *Polymer Engineering and Science*, 55 (3), 485-498.
- Hajmohammadi, A., Pirouzifard, M., Shahedi, M. ve Alizadeh, M. 2016. Enrichment of a fruit-based beverage in dietary fiber using basil seed: Effect of Carboxymethyl cellulose and Gum Tragacanth on stability. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 84-91.
- Han, Z., Cai, M.J., Cheng, J.H. ve Sun, D.W., 2018. Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 1-9.
- Hanafi, M.A., Hashim, S.N., Chay, S.Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul-Hamid, A. ve Saari, N., 2018. High angiotensin-I converting enzyme

- (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. Food Research International, 106, 589-597.
- Haney, E.F. ve Hancock, R.E., 2013. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. Peptide Science, 100 (6), 572-583.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D.L. ve Niranjana, K., 2002. Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77 (7), 771-776.
- Hartmann, R. ve Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Current Opinion in Biotechnology, 18 (2), 163-169.
- Hastreiter, A.A., Dos Santos, G.G., Santos, E.W. C., Makiyama, E.N., Borelli, P. ve Fock, R.A., 2020. Protein malnutrition impairs bone marrow endothelial cells affecting hematopoiesis. Clinical Nutrition, 39 (5), 1551-1559.
- Hosseini-Parvar, S.H., Matia-Merino, L., Goh, K.K.T., Razavi, S.M.A. ve Mortazavi, S.A., 2010. Steady shear flow behavior of gum extracted from *Ocimum basilicum* L. seed: Effect of concentration and temperature. Journal of Food Engineering, 101 (3), 236-243.
- Hou, Y. ve Wu, G., 2018. Nutritionally essential amino acids. Advances in Nutrition, 9 (6), 849-851.
- Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N. ve Karboune, S., 2018. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. Food Chemistry, 254, 367-376.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X. ve Pan, S., 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. Food Hydrocolloids, 30 (2), 647-655.
- Hu, H., Zhu, X., Hu, T., Cheung, I.W., Pan, S. ve Li-Chan, E., 2015. Effect of ultrasound pre-treatment on formation of transglutaminase-catalysed soy protein hydrogel as a riboflavin vehicle for functional foods. Journal of Functional Foods, 19, 182-193.
- Hunsakul, K., Laokuldilok, T., Sakdatorn, V., Klangpetch, W., Brennan, C.S. ve Utama-Ang, N., 2022. Optimization of enzymatic hydrolysis by alcalase and flavourzyme to enhance the antioxidant properties of jasmine rice bran protein hydrolysate. Scientific Reports, 12 (1), 12582.
- Hwang, J.T., Ahn, C.W., Kim, H.J., Lee, K.A., Park, O.J. ve Kwon, D.Y., 2011. Black soybean peptide mixture purified from *Rhynchosia volubilis* exerts antioxidant activity against H₂O₂-induced cytotoxicity and improves thrombosis. Journal of Medicinal Plants Research, 5 (29), 6477-6483.
- Ibrahim, A.H., Attia, E.Z., Hajjar, D., Anany, M.A., Desoukey, S.Y., Fouad, M.A., Kamel, M.S., Wajant, H., Gulder, T.A.M. ve Abdelmohsen, U.R., 2018. New cytotoxic cyclic peptide from the marine sponge-associated *Nocardiopsis* sp. UR67. Marine Drugs, 16 (9), 290.

- Imam, H., Lian, S., Kasimu, R., Rakhmanberdyeva, R.K. ve Aisa, H.A., 2012. Extraction of an antidiabetic polysaccharide from seeds of *Ocimum basilicum* and determination of the monosaccharide composition by precolumn high-efficiency capillary electrophoresis. *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (4), 653-654.
- Inouye, K., Nakano, K., Asaoka, K. ve Yasukawa, K., 2009. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2), 717-723.
- Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N. ve Khan, M.S., 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97 (2), 331-335.
- Iqbal, S., 2022. High Protein Foods: A Comparison of Animal Origin vs Plant Origin. *Plant Protein Foods*, Eds: A. Manickavasagan, L.T. Lim, A. Ali. Springer International Publishing, Switzerland, 1-25.
- Isleroglu, H. ve Olgun, G.N., 2024. Effects of the extraction conditions on functional and structural characteristics of proteins from fenugreek seeds. *Acta Chimica Slovenica*, 71 (2), 204-214.
- Israr, T., Rakha, A., Rashid, S., Shehzad, A., Ahmed, W. ve Sohail, M., 2017. Effect of basil seed gum on physico-chemical and rheological properties of bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (5), e13128.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P. ve Darewicz, M., 2014. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13 (2), 114-134.
- Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Krešić, G. ve Badanjak, M., 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93 (4), 386-393.
- Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z. ve Herceg, I.L., 2008. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86, 281-287.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. ve Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121 (1), 178-184.
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T.M., Almajwal, A., Abulmeaty, M.M. ve Feng, H., 2017. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842.
- Jung, S., Lamsal, B.P., Stepien, V., Johnson, L.A. ve Murphy, P.A., 2006. Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (1), 71-78.
- Kamal, H., Mudgil, P., Bhaskar, B., Fisayo, A.F., Gan, C.Y. ve Maqsood, S., 2021. Amaranth proteins as potential source of bioactive peptides with enhanced

- inhibition of enzymatic markers linked with hypertension and diabetes. *Journal of Cereal Science*, 101, 103308.
- Kamali, A.E. ve Ehsani, M.R., 2017. Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7 (1), 49-56.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N.S., Lay, J.O. ve Liyanage, R., 2010. Human cancer cell proliferation isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31 (9), 1629-1634.
- Karabulut, G., Feng, H. ve Yemiş, O., 2022. Physicochemical and antioxidant properties of industrial hempseed protein isolate treated by high-intensity ultrasound. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77 (4), 577-583.
- Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A. ve Kulczyk, A., 2016. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (7), 1027.
- Kareem, A.A., Shakir, K.A. ve Walsh, M.K., 2018. Antioxidant activities of okra protein concentrate and isolate after enzymatic hydrolysis. *Food and Nutrition Sciences*, 9 (9), 1066-1077.
- Karlığa, E.S., 2020. *Spirulina platensis*'ten Elde Edilen Biyoaktif Peptitlerin Enkapsülasyonu ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Aksaray Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Karnchanatat, A., Semanit, K., Noitang, S., ve Piapukiew, J., 2014. Comparative study on antioxidative activity of the seeds of hoary basil (*Ocimum basilicum*) protein hydrolysates produced by papain, pepsin and Protease G6 (alcalase). *Proceedings of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*, Phuket, Thailand (pp. 6-8).
- Kaur, M. ve Singh, N., 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102 (1), 366-374.
- Khaliq, R., Tita, O. ve Sava, C.S., 2017. A comparative study between seeds of sweet basil and psyllium on the basis of proximate analysis. *Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 17 (3), 189-194.
- Kheeree, N., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, O., Choowongkamon, K. ve Karnchanatat, A., 2020. ACE inhibitory peptides derived from de-fatted lemon basil seeds: Optimization, purification, identification, structure–activity relationship and molecular docking analysis. *Food and Function*, 11 (9), 8161-8178.
- Kılıç, G.B. ve Karahan, A.G., 2010. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması. *Gıda*, 35 (6), 445-452.
- Kim, S.Y., Hyeonbin, O., Lee, P. ve Kim, Y.S., 2020. The quality characteristics, antioxidant activity, and sensory evaluation of reduced-fat yogurt and nonfat yogurt supplemented with basil seed gum as a fat substitute. *Journal of Dairy Science*, 103 (2), 1324-1336.
- Kiosseoglou, V., Paraskevopoulou, A. ve Poojary, M.M., 2021. Functional and physicochemical properties of pulse proteins. In *Pulse Foods* (pp. 113-146).

- Academic Press. Pearce, K.N. ve Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (3), 716-723.
- Kong, J. ve Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (8), 549-559.
- Kong, L.Y., Abou-Ghazal, M.K., Wei, J., Chakraborty, A., Sun, W., Qiao, W., Fuller, G.N., Fokt, I., Grimm, E.A., Schmittling, R.J., Archer, G.E.Jr., Sampson, J.H., Priebe, W. ve Heimberger, A.B., 2008. A novel inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 activation is efficacious against established central nervous system melanoma and inhibits regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*, 14 (18), 5759-5768.
- Korhonen, H. ve Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (9), 945-960.
- Kovacs-Nolan, J., Zhang, H., Ibuki, M., Nakamori, T., Yoshiura, K., Turner, P.V., Matsui, T. ve Mine, Y., 2012. The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820 (11), 1753-1763.
- Kramer, A. ve Kwee, W.H., 1977. Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *Journal of Food Science*, 42 (1), 207-211.
- Kristinsson, H.G. ve Rasco, B.A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (1), 43-81.
- Kumar, K., Srivastav, S. ve Sharanagat, V.S., 2021a. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- Kumar, M., Potkule, J., Patil, S., Saxena, S., Patil, P.G., Mageshwaran, V., Punia, S., Varghese, E., Mahapatra, A., Ashtaputre, N., Souza, C.D. ve Kennedy, J.F., 2021c. Extraction of ultra-low gossypol protein from cottonseed: Characterization based on antioxidant activity, structural morphology and functional group analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 140, 110692.
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dajuha, A., Joshi, S., Berwal, M.K., Satankar, V., Bhoite, A.G., Amarowicz, R., Kaur, C. ve Kennedy, J.F., 2021b. Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Langyan, S., Yadava, P., Khan, F.N., Dar, Z.A., Singh, R. ve Kumar, A., 2022. Sustaining protein nutrition through plant-based foods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 772573.
- Lee, C.H. ve Chin, K.B. 2020. Physical properties and structural changes of myofibrillar protein gels prepared with basil seed gum at different salt levels and application to sausages. *Foods*, 9 (6), 702.

- Lee, S.Y. ve Hur, S.J. 2017. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506-517.
- Li, C., Bu, G., Chen, F. ve Li, T., 2020b. Preparation and structural characterization of peanut peptide–zinc chelate. *CyTA-Journal of Food*, 18 (1), 409-416.
- Li, C., Yang, F., Huang, Y., Huang, C., Zhang, K. ve Yan, L., 2020a. Comparison of hydrodynamic and ultrasonic cavitation effects on soy protein isolate functionality. *Journal of Food Engineering*, 265, 109697.
- Li, H. ve Aluko, R.E., 2005. Kinetics of the inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by pea protein-derived peptides. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 (11), 656-662.
- Li, J., Fu, J., Ma, Y., He, Y., Fu, R., Qayum, A. ve Wang, L., 2022. Low temperature extrusion promotes transglutaminase cross-linking of whey protein isolate and enhances its emulsifying properties and water holding capacity. *Food Hydrocolloids*, 125, 107410.
- Li, X.X., Han, L.J. ve Chen, L.J., 2008. *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (9), 1660-1666.
- Liu, C.M., Peng, Q., Zhong, J.Z., Liu, W., Zhong, Y.J. ve Wang, F., 2018. Molecular and functional properties of protein fractions and isolate from cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). *Molecules*, 23 (2), 393.
- Liu, J.J., Gasmalla, M.A.A., Li, P. ve Yang, R., 2016. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 184-193.
- Liu, M., Toth, J.A., Childs, M., Smart, L.B. ve Abbaspourrad, A., 2023. Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars. *Journal of Food Science*. 88 (3), 942-951.
- Liu, W., Chen, X., Li, H., Zhang, J., An, J. ve Liu, X. 2022a. Anti-inflammatory function of plant-derived bioactive peptides: A review. *Foods*, 11 (15), 2361.
- Liu, X., Wang, M., Xue, F. ve Adhikari, B., 2022b. Application of ultrasound treatment to improve the technofunctional properties of hemp protein isolate. *Future Foods*, 6, 100176.
- Lu, X., Zhang, L., Sun, Q., Song, G. ve Huang, J., 2019. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate. *Food Research International*, 116, 707-716.
- Ly, H.L., Tran, T.M. C., Tran, T.T.T., Ton, N.M.N. ve Le, V.V.M., 2018. Application of ultrasound to protein extraction from defatted rice bran. *International Food Research Journal*, 25 (2), 695-701.
- Mabood, F., Gilani, S.A., Hussain, J., Alshidani, S., Alghawi, S., Albroumi, M., Alameri, S., Jabeen, F., Hussain, Z., Al-Harrasi, A., Al Abri, Z.K.M., Farooq, S., naureen, Z., Hamaed, A., Jan, M.R. ve Shah, J., 2017. New design of experiment combined with UV–Vis spectroscopy for extraction and estimation of polyphenols from Basil seeds, Red seeds, Sesame seeds and Ajwan seeds.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 178, 14-18.
- Marambe, P.W.M.L.H.K., Shand, P.J. ve Wanasundara, J.P.D., 2008. An in-vitro investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. Journal of the American Oil Chemists' Society, 85, 1155-1164.
- Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y. ve Doyen, A., 2018. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. Trends in Food Science and Technology, 80, 187-198.
- Mathai, J.K., Liu, Y. ve Stein, H.H., 2017. Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). British Journal of Nutrition, 117 (4), 490-499.
- Mathews, S., Singhal, R.S. ve Kulkarni, P.R., 1993. *Ocimum basilicum*: A new non-conventional source of fibre. Food Chemistry, 47 (4), 399-401.
- Matsumoto, T., Shishido, A., Morita, H., Itokawa, H. ve Takeya, K., 2001. Cyclolino peptides F-I, cyclic peptides from linseed. Phytochemistry, 57 (2), 251-260.
- McClements, D.J., 2018. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. Advances in Colloid and Interface Science, 253, 1-22.
- Megías, C., Pedroche, J., del Mar Yust, M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F. ve Vioque, J., 2009. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. LWT-Food Science and Technology, 42(9), 1496-1500.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. ve Vioque, J., 2007. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (10), 3949-3954.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. ve Vioque, J., 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. LWT - Food Science and Technology, 41 (10), 1973-1977.
- Miguel, M., Aleixandre, M.A., Ramos, M. ve López-Fandiño, R., 2006. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (3), 726-731.
- Miller, G.L., 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Analytical Chemistry, 31 (3), 426-428.
- Mine, Y., 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. Trends in Food Science and Technology, 6 (7), 225-232.

- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. ve Brodkorb, A., 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5 (6), 1113-1124.
- Mir, N.A., Riar, C.S. ve Singh, S., 2019. Structural modification of quinoa seed protein isolates (QPIs) by variable time sonification for improving its physicochemical and functional characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104700.
- Mochizuki, M., Shigemura, H. ve Hasegawa, N., 2010. Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62 (3), 389-392.
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. ve Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47 (4), 171-182.
- Morales, R., Martínez, K.D., Ruiz-Henestrosa, V.M.P. ve Pilosof, A.M., 2015. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 48-55.
- Mudgil, P., Ajayi, F.F., Alkaabi, A., Alsubousi, M., Singh, B.P. ve Maqsood, S. 2023. Flaxseed-and chia seed-derived protein hydrolysates exhibiting enhanced *in vitro* antidiabetic, anti-obesity, and antioxidant properties. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1223884.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D. ve Astiasarán, I., 2004. New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (9), 452-457.
- Mulla, M. ve Ahmed, J. 2019. Modulating functional and antioxidant properties of proteins from defatted garden cress (*Lepidium sativum*) seed meal by Alcalase hydrolysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13 (4), 3257-3266.
- Mune, M.A.M., Minka, S.R. ve Henle, T., 2018. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 250, 162-169.
- Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J. ve Man, Y.B. C. 1999. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, 67 (4), 435-443.
- Nadar, S.S., Rao, P. ve Rathod, V.K., 2018. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330.
- Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D. ve Scanlin, L., 2017. Proteins in the Diet: Challenges in Feeding the Global Population. *Sustainable Protein Sources*, Eds:

- S.R. Nadathur, J.P.D. Wanasundarave L. Scanlin. Academic Press, London, United Kingdom, 1–19.
- Nadeem, F., Hanif, M.A., Bhatti, I.A., Jilani, M.I. ve Al-Yahyai, R., 2020. Basil (Chapter 4). Medicinal Plants of South Asia, Eds: M.A. Hanif, H. Nawaz, M.M. Khan, H.J. Byrne. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 47-62.
- Naji-Tabasi, S. ve Razavi, S.M.A., 2016. New studies on basil (*Ocimum bacilicum* L.) seed gum: Part II-Emulsifying and foaming characterization. Carbohydrate Polymers, 149, 140-150.
- Naji-Tabasi, S. ve Razavi, S.M.A., 2017. Functional properties and applications of basil seed gum: An overview. Food Hydrocolloids, 73, 313-325.
- Naseri, A., Marinho, G.S., Holdt, S.L., Bartela, J.M., ve Jacobsen, C., 2020. Enzyme-assisted extraction and characterization of protein from red seaweed *Palmaria palmata*. Algal Research, 47, 101849.
- Nazir, S. ve Wani, I.A., 2023. Protein isolate from basil seeds (*Ocimum basilicum* L.): physicochemical and functional characterisation. Food Chemistry Advances, 3, 100424.
- Neto, V.Q., Narain, N., Silva, J.B. ve Bora, P.S., 2001. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale*, L.) kernel protein isolates. Food/Nahrung, 45 (4), 258-262.
- Ngo, Y.Y., Tye, G.J. ve Gan, C.Y., 2017. The investigation of α -amylase inhibitory activity of selected Pinto bean peptides via preclinical study using AR42J cell. Journal of Functional Foods, 35, 641-647.
- Nguyen, T.H. ve Le, V.V.M., 2019. Effects of technological parameters of ultrasonic treatment on the protein extraction yield from defatted peanut meal. International Food Research Journal, 26 (3), 1079-1085.
- Niu, Y.X., Li, W., Zhu, J., Huang, Q., Jiang, M. ve Huang, F., 2012. Aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein from dehulled cold-pressed double-low rapeseed cake. International Journal of Food Engineering, 8 (3), Article 7, 1-14.
- O'Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R. ve Norton, I., 2014. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. Food Hydrocolloids, 42, 386-396.
- Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S.O. ve Chuck-Hernández, C., 2017. Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. Food and Bioprocess Technology, 10, 543-555.
- Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L. ve Arihara, K., 2016. Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. Food Chemistry, 194, 1034-1039.
- Olivos-Lugo, B.L., Valdivia-López, M.Á. ve Tecante, A., 2010. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). Food Science and Technology International, 16 (1), 89-96.

- Osano, J.P., Hosseini-Parvar, S.H., Matia-Merino, L. ve Golding, M., 2014. Emulsifying properties of a novel polysaccharide extracted from basil seed (*Ocimum basilicum* L.): Effect of polysaccharide and protein content. *Food Hydrocolloids*, 37, 40-48.
- Oseguera-Toledo, M.E., de Mejia, E.G. ve Amaya-Llano, S.L., 2015. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, 76, 839-851.
- Pazinatto, C., Malta, L.G., Pastore, G.M. ve Maria Netto, F., 2013. Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33, 485-493.
- Pearce, K.N. ve Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (3), 716-723.
- Pereira, D.G., Justus, A., Falcão, H.G., Rocha, T.D.S., Ida, E.I. ve Kurozawa, L.E., 2019. Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43 (10), e14134.
- Perović, M.N., Jugović, Z.D.K. ve Antov, M.G., 2020. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction. *Journal of Food Engineering*, 276, 109894.
- Perović, M.N., Pajin, B.S. ve Antov, M.G., 2022. The effect of enzymatic pretreatment of chickpea on functional properties and antioxidant activity of alkaline protein isolate. *Food Chemistry*, 374, 131809.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. ve Korhonen, H., 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67 (1), 53-64.
- Pojić, M., Mišan, A. ve Tiwari, B., 2018. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 93-104.
- Pownall, T.L., Udenigwe, C.C. ve Aluko, R.E. 2011. Effects of cationic property on the *in vitro* antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Research International*, 44 (4), 1069-1074.
- Preece, K.E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P.J. ve Zuidam, N.J., 2017. Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 113, 94-101.
- Purcell, M., Novetta-Delen, A., Arakawa, H., Malonga, H. ve Tajmir-Riahi, H.A., 1999. Interaction of RNase A with VO_3^- and VO^{2+} ions. Metal ion binding mode and protein secondary structure. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17 (3), 473-480.
- Pushpangadan, P. ve George, V., 2012. Basil. *Handbook of Herbs and Spices* 2nd ed., Ed: K.V. Peter, Wood head Publishing, United Kingdom, 55-70.

- Putievsky, E. ve Galambosi, B., 1999. Production Systems of Sweet Basil. Basil The Genus *Ocimum*, Eds: R. Hiltunen, Y. Holm. CRC Press, USA, 47-73.
- Qi, M., Hettiarachchy, N.S. ve Kalapathy, U., 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62 (6), 1110-1115.
- Qiaoyun, C., Xinghong, N., Liang, Z., Zheng, T., Jin, L., Kang, S., Xuan, C. ve Xinghui, L., 2017. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. *Horticultural Plant Journal*, 3 (4), 172-176.
- Rahman, M.M., Dutta, S. ve Lamsal, B.P., 2021. High-power sonication-assisted extraction of soy protein from defatted soy meals: Influence of important process parameters. *Journal of Food Process Engineering*, 44 (7), e13720.
- Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A. P., Derita, M. ve Zacchino, S., 2017. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519 (1-2), 67-78.
- Rashid, M. ve Gülseren, İ., 2024. Fractionation and characterization of heat-stable basil seed protein isolates and their utilization in high protein gluten-free bread. *Sustainable Food Proteins*, 2 (2), 78-88.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D. ve Dhulster, P., 2018. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2354.
- Ray, B. ve Bhunia, A., 2007. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, 492 p, USA.
- Razavi, S.M., Bostan, A. ve Rezaie, M. 2010. Image processing and physico-mechanical properties of basil seed (*Ocimum basilicum*). *Journal of Food Process Engineering*, 33 (1), 51-64.
- Resendiz-Vazquez, J.A., Ulloa, J.A., Urias-Silvas, J.E., Bautista-Rosales, P.U., Ramírez-Ramírez, J.C., Rosas-Ulloa, P., ve González-Torres, L., 2017. Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436-444.
- Reyes-Díaz, A., Del-Toro-Sánchez, C.L., Rodríguez-Figueroa, J.C., Valdéz-Hurtado, S., Wong-Corral, F.J., Borboa-Flores, J., González-Osuna, M.F., Perez-Perez, L.M. ve González-Vega, R.I., 2019. Legume proteins as a promising source of anti-inflammatory peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 20 (12), 1204-1217.
- Rodrigues, I.M., Carvalho, M.G. V.S. ve Rocha, J.M.S., 2014. Increasing the protein content of rapeseed meal by enzymatic hydrolysis of carbohydrates, *Bioresource Technology*, 9 (2), 2010-2025.
- Rommi, K., Ercili-Cura, D., Hakala, T.K., Nordlund, E., Poutanen, K. ve Lantto, R., 2015. Impact of total solid content and extraction pH on enzyme-aided recovery of protein from defatted rapeseed (*Brassica rapa* L.) press cake and

- physicochemical properties of the protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (11), 2997-3003.
- Rommi, K., Hakala, T.K., Holopainen, U., Nordlund, E., Poutanen, K. ve Lantto, R., 2014. Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassicarapa* L. and *Brassicacanapus* L.) press cakes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (32), 7989-7997.
- Rosset, M. ve Beléia, A.D.P., 2014. Pre-treatment of soy slurry with Viscozyme L and the concentration of sugars and isoflavones and the microstructure of silken tofu. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2 (3), 130-135.
- Sabaté, J. ve Soret, S., 2014. Sustainability of plant-based diets: back to the future. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 476-482.
- Sabaté, J., Sranacharoenpong, K., Harwatt, H., Wien, M. ve Soret, S., 2015. The environmental cost of protein food choices. *Public Health Nutrition*, 18 (11), 2067-2073.
- Sánchez, A. ve Vázquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1 (1), 29-46.
- Sari, E., Loğoğlu, E. ve Öktemer, A., 2015. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34. *Biomedical Chromatography*, 29 (9), 1356-1363.
- Sari, Y.W., Bruins, M.E. ve Sanders, J.P., 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83.
- Sarmadi, B.H. ve Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31 (10), 1949-1956.
- Sbroggio, M.F., Montilha, M.S., Figueiredo, V.R.G.D., Georgetti, S.R. ve 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.
- Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A. ve Betancur-Ancona, D.A., 2011. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry*, 46 (4), 864-872.
- Segura-Campos, M.R., Salazar-Vega, I.M., Chel-Guerrero, L.A. ve Betancur-Ancona, D.A., 2013. Biological potential of chia (*Salviahispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 50 (2), 723-731.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A. ve Rana, J.C., 2015. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
- Sim, S.Y.J., Srv, A., Chiang, J.H. ve Henry, C.J., 2021. Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods*, 10 (8), 1967.

- Singh, B.P., Aluko, R.E., Hati, S. ve Solanki, D., 2021. Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (17), 4593-4606.
- Siow, H.L. ve Gan, C.Y., 2017. Optimization study in extracting anti-oxidative and α -amylase inhibitor peptides from cumin seeds (*Cuminum Cyminum*). *Journal of Food Biochemistry*, 41 (1), e12280.
- Sompinit, K., Lersiripong, S., Reamtong, O., Pattarayingsakul, W., Patikarnmonthon, N. ve Panbangred, W., 2020. In vitro study on novel bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive properties from edible rhizomes. *LWT – Food Science and Technology*, 134, 110227.
- Song, K.Y. ve Kim, Y.S., 2019. Effect of mucilage extracted from Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds on physicochemical and rheological properties in low-fat milk protein gel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43 (11), e14191.
- Song, K.Y., Joung, K.Y., Shin, S.Y. ve Kim, Y.S., 2017. Effects of basil (*Ocimum basilicum* L.) seed mucilage substituted for fat source in sponge cake: Physicochemical, structural, and retrogradation properties. *Italian Journal of Food Science*, 29(4), 681-696.
- Song, W., Kong, X., Hua, Y., Li, X., Zhang, C. ve Chen, Y., 2020. Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion stability of cottonseed protein hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 118, 108724.
- Souza, T.S., Dias, F.F., Koblitiz, M.G. ve MLN de M. Bell, J., 2019. Aqueous and enzymatic extraction of oil and protein from almond cake: A comparative study. *Processes*, 7 (7), 472.
- Tabtabaei, S. ve Diosady, L.L., 2013. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*, 52 (2), 547-556.
- Tang, C.H., Ten, Z., Wang, X.S. ve Yang, X.Q., 2006. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (23), 8945-8950.
- Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H. ve Qi, X., 2015. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 115-123.
- Tavano, O.L., 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Tavares, T., del Mar Contreras, M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I. ve Malcata, F.X., 2011. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: *In vitro* effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32 (5), 1013-1019.
- Tay, E.L., Peset, A., Papaphylactou, M., Inuzuka, R., Alonso-Gonzalez, R., Giannakoulas, G., Tzifa, A., Goletto, S., Broberg, C., Dimopoulos, K. ve Gatzoulis, M.A., 2011. Replacement therapy for iron deficiency improves exercise capacity and quality of life in patients with cyanotic congenital heart

- disease and/or the Eisenmenger syndrome. *International Journal of Cardiology*, 151 (3), 307-312.
- Thakur, S., Pandey, A.K., Verma, K., Shrivastava, A. ve Singh, N., 2024. Plant-based protein as an alternative to animal proteins: A review of sources, extraction methods and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 59 (1), 488-497.
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Barrow, C.J. ve Adhikari, B., 2016. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Tok, K., Moulahoum, H., Kocadag Kocazorbaz, E. ve Zihnioglu, F., 2021. Bioactive peptides with multiple activities extracted from Barley (*Hordeum vulgare* L.) grain protein hydrolysates: Biochemical analysis and computational identification. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (1), e15024.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.C. ve Mora, L., 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food chemistry*, 267, 395-404.
- Torres-Fuentes, C., del Mar Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M. ve Vioque, J., 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G. ve Betancur-Ancona, D., 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 42 (10), 1597-1604.
- Trigui, I., Yaich, H., Sila, A., Cheikh-Rouhou, S., Krichen, F., Bougatef, A., Attia, H. ve Ayadi, M.A., 2021. Physical, techno-functional and antioxidant properties of black cumin seeds protein isolate and hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15 (4), 3491-3500.
- Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T. ve Yoshikawa, M., 2003. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS Letters*, 540 (1-3), 206-210.
- Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M.L., Mikkola, L., Jauhianen, T., Seppo, L. ve Nissinen, A., 2004. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 18 (11), 795-802.
- Turker, I. ve Isleroglu, H., 2024. Ultrasound and enzymatic treatments to improve protein extraction from cress seeds, and the characterization of protein isolates. *Food Bioscience*, 60, 104443.
- Turker, I., Olgun, G.N. ve Isleroglu, H., 2024. Fenugreek seed proteins: Ultrasonic-assisted extraction, characterization, and cupcake application. *Food Science and Nutrition*, 12 (9), 6353-6366.

- Udenigwe, C.C. ve Aluko, R.E., 2010. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8), 4762-4768.
- Udenigwe, C.C. ve Aluko, R.E., 2012. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77 (1), 11-24.
- Udenigwe, C.C., Abioye, R.O., Okagu, I.U. ve Obeme-Nmom, J.I., 2021. Bioaccessibility of bioactive peptides: Recent advances and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 39, 182-189.
- Uematsu, Y., Ogata, F., Saenjum, C., Nakamura, T. ve Kawasaki, N., 2020. Removing Sr (II) and Cs (I) from the aqueous phase using basil seed and elucidating the adsorption mechanism. *Sustainability*, 12 (7), 2895.
- Ulug, S.K., Jahandideh, F. ve Wu, J., 2021. Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 27-39.
- Van Stokkum, I.H.M., Linsdell, H., Hadden, J.M., Haris, P.I., Chapman, D. ve Bloemendal, M., 1995. Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry*, 34 (33), 10508-10518.
- Vásquez, V., Martínez, R. ve Bernal, C., 2019. Enzyme-assisted extraction of proteins from the seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Chondracanthus chamissoi*: characterization of the extracts and their bioactive potential. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1999-2010.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. ve Peričin, D., 2011. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124 (4), 1316-1321.
- Velliquette, R.A., Fast, D.J., Maly, E.R., Alashi, A.M. ve Aluko, R.E., 2020. Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NFκB and promote monocyte differentiation to a dendritic cell phenotype. *Food Chemistry*, 319, 126563.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M. ve Simó-Alfonso, E.F., 2014. Efficient extraction of olive pulp and stone proteins by using an enzyme-assisted method. *Journal of Food Science*, 79 (7), 1298-1304.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C. ve Hernández-Ledesma, B., 2017. Release of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531-539.
- Vilkhu, K., Manasseh, R., Mawson, R. ve Ashokkumar, M., 2010. Ultrasonic Recovery and Modification of Food Ingredients. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Eds: H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss. Springer, New York, USA, 345-368.

- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z. ve Li, D., 2011. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Engineering*, 15, 4819-4827.
- Wang, C., Li, B. ve Ao, J., 2012. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134 (2), 1231-1238.
- Wang, C., Li, B., Wang, B. ve Xie, N., 2015. Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc-peptide complexes during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 173, 733-740.
- Wang, F., Zhang, Y., Xu, L. ve Ma, H., 2020a. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein functional properties and biological activities. *LWT - Food Science and Technology*, 127, 109348.
- Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W. ve Siebenmorgen, T., 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (2), 411-416.
- Wang, Q., Wang, Y., Huang, M., Hayat, K., Kurtz, N.C., Wu, X., Ahmad, M. ve Zheng, F., 2021. Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, 105789.
- Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S. ve Wei, J., 2017b. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 93-99.
- Wang, X., Yu, H., Xing, R. ve Li, P., 2017a. Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International*, 2017 (1), 9746720.
- Wang, Y. ve Selomulya, C., 2020. Spray drying strategy for encapsulation of bioactive peptide powders for food applications. *Advanced Powder Technology*, 31 (1), 409-415.
- Wang, Y., Wang, Y., Li, K., Bai, Y., Li, B. ve Xu, W., 2020b. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical, interfacial and gel properties of chickpea protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 129, 109563.
- Wani, A.A., Kaur, D., Ahmed, I. ve Sogi, D.S., 2008. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (8), 1514-1520.
- Wickham, M., Faulks, R. ve Mills, C., 2009. *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (8), 952-958.
- Withana-Gamage, T.S., Wanasundara, J.P., Pietrasik, Z. ve Shand, P.J., 2011. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): A comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (6), 1022-1031.

- Wu, J. ve Ding, X., 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35 (4), 367-375.
- Xu, Z., Mao, T.M., Huang, L., Yu, Z.C., Yin, B., Chen, M.L. ve Cheng, Y.H., 2019. Purification and identification immunomodulatory peptide from rice protein hydrolysates. *Food and Agricultural Immunology*, 30 (1), 150-162.
- Xue, Z., Wen, H., Zhai, L., Yu, Y., Li, Y., Yu, W., Cheng, A., Wang, C. ve Kou, X., 2015. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 77, 75-81.
- Yadavalli, S.S., Carey, J.N., Leibman, R.S., Chen, A.I., Stern, A.M., Roggiani, M., Lippa, A.M. ve Goulian, M., 2016. Antimicrobial peptides trigger a division block in *Escherichia coli* through stimulation of a signalling system. *Nature Communications*, 7 (1), 12340.
- Yang, C., Liu, W., Zhu, X., Zhang, X., Wei, Y., Huang, J., Yang, F. ve Yang, F., 2024b. Ultrasound-assisted enzymatic digestion for efficient extraction of proteins from quinoa. *LWT - Food Science and Technology*, 194, 115784.
- Yang, J.S., Dias, F.F., Pham, T.T. K., Barile, D. ve de Moura Bell, J.M., 2024a. A sequential fractionation approach to understanding the physicochemical and functional properties of aqueous and enzyme-assisted aqueous extracted black bean proteins. *Food Hydrocolloids*, 146, 109250.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A.O., Wang, Y., Huang, S., Zhou, C., Ye, X., Ma, H. ve Duan, Y., 2018. Effects of ultrasound-assisted α -amylase degradation treatment with multiple modes on the extraction of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 890-899.
- Yao, H., Yang, J., Zhan, J., Lu, Q., Su, M. ve Jiang, Y., 2021. Preparation, amino acid composition, and in Vitro antioxidant activity of okra seed meal protein hydrolysates. *Food Science and Nutrition*, 9 (6), 3059-3070.
- Yao, S., Li, W., Wu, Y., Martin, G.J. ve Ashokkumar, M., 2023. The impact of high-intensity ultrasound-assisted extraction on the structural and functional properties of hempseed protein isolate (HPI). *Foods*, 12 (2), 348.
- Yi-Shen, Z., Shuai, S. ve FitzGerald, R., 2018. Mung bean proteins and peptides: Nutritional, functional and bioactive properties. *Food and Nutrition Research*, 62, 1290.
- Zaky, A.A., Simal-Gandara, J., Eun, J.B., Shim, J.H. ve Abd El-Aty, A.M., 2022. Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 815640.
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G. ve Trziszka, T., 2013. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44, 315-320.
- Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M. ve 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.

- Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X. ve Zhou, X., 2009. Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science*, 3 (3), 77-82.
- Zhang, Q., Li, Y., Wang, Z., Qi, B., Sui, X. ve Jiang, L., 2019b. Recovery of high value-added protein from enzyme-assisted aqueous extraction (EAE) of soybeans by dead-end ultrafiltration. *Food Science and Nutrition*, 7 (2), 858-868.
- Zhang, R., Chen, J. ve Zhang, X., 2018. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresource Technology*, 247, 267-272.
- Zhang, S.B., Wang, Z. ve Xu, S.Y., 2007. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84 (1), 97-105.
- Zhang, Y., Wang, B., Zhang, W., Xu, W. ve Hu, Z., 2019a. Effects and mechanism of dilute acid soaking with ultrasound pretreatment on rice bran protein extraction. *Journal of Cereal Science*, 87, 318-324.
- Zhao, Y., Wen, C., Feng, Y., Zhang, J., He, Y., Duan, Y. ve Ma, H., 2021. Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of *Dolichos lablab* L. protein. *Process Biochemistry*, 101, 274-284.
- Zhu, Q., Chen, Z., Paul, P.K., Lu, Y., Wu, W. ve Qi, J., 2021. Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (8), 2416-2448.
- Zhu, Z., Qiu, N. ve Yi, J., 2010. Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 231, 13-19.
- Ziemichód, A., Wójcik, M. ve Różyło, R., 2019. *Ocimum tenuiflorum* seeds and *Salvia hispanica* seeds: mineral and amino acid composition, physical properties, and use in gluten-free bread. *CyTA-Journal of Food*, 17 (1), 804-813.
- Zuber, H., 1988. Temperature adaptation of lactate dehydrogenase Structural, functional and genetic aspects. *Biophysical Chemistry*, 29 (1-2), 171-179.