

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kardelen CEMEK

**OLGUNLAŞTIRILMIŞ KARS KAŞAR PEYNİRİNDEKİ
PEPTİTLERİN İZOLASYONU VE BİYOAKTİF
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLGUNLAŞTIRILMIŞ KARS KAŞAR PEYNİRİNDEKİ PEPTİTLERİN
İZOLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kardelen CEMEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 08/04/2020 Tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Serkan SELLİ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-10570**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OLGUNLAŞTIRILMIŞ KARS KAŞAR PEYNİRİNDEKİ PEPTİTLERİN İZOLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kardelen CEMEK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
Yıl : 2020, Sayfa : 99
Jüri : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
: Prof. Dr. Serkan SELLİ
: Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK

Bu çalışmada olgunlaştırılmış Kars Kaşar peynirinden elde edilen peptit fraksiyonları, antibakteriyel, antioksidan ve ADE inhibitörü aktivite gibi bazı biyoaktif özellikler açısından değerlendirilmiştir. Peynirden elde edilen suda çözünür özütlerin doğrudan ve enzimatik hidrolizi sonrası ultrafiltre edilmesi ile açığa çıkan 4 farklı peptit fraksiyonunun (F₁, F₂, F₃ ve F₄) antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyonu ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) analizleri ile incelenmiş olup *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde herhangi bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla DPPH ve FRAP analizleri uygulanmış, en yüksek antioksidan aktivite FRAP sonucunda 798.12±14.18 mM Trolox/g ekstrakt değeri ile F₄ adlı fraksiyonda gözlenmiştir. DPPH analizi sonucunda ise en yüksek aktivite F₃ adlı fraksiyonda 70.13±0.38 mM Trolox/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Fraksiyonların ADE enzimini inhibe etme yüzdesi F₁ ve F₂ fraksiyonlarında (%100 inhibisyon ile) oldukça yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra en küçük IC₅₀ değeri 1.00 mg/mL ile F₂ fraksiyonunda gözlenmiştir. Diğer fraksiyonların IC₅₀ değerleri küçükten büyüğe doğru F₃ (IC₅₀=3.22 mg/mL), F₁ (IC₅₀=7.96 mg/mL) ve F₄ (IC₅₀= 141.64 mg/mL) şeklinde belirlenmiştir. En düşük inhibitör etki, en yüksek IC₅₀ değeri ile F₄ fraksiyonunda görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Olgunlaştırılmış Kars Kaşar peyniri, biyoaktif peptit, ADE inhibisyonu, antioksidan aktivite, antibakteriyel aktivite.

ABSTRACT

MSc THESIS

ISOLATION AND DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDES IN RIPENED KARS KASHAR CHEESE

Kardelen CEMEK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
Year : 2020, Pages :99
Jury : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
: Prof. Dr. Serkan SELLİ
: Assoc. Prof. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK

In this study, peptide fractions obtained from ripened Kars Kashar cheese were evaluated for some bioactive properties such as antibacterial, antioxidant and ACE inhibitory activity. The antibacterial activities of 4 different peptide fractions (F₁, F₂, F₃ and F₄) released by direct and enzymatic hydrolysis of water-soluble extracts were investigated by disk diffusion and minimum inhibitor concentration (MIC) analyzes, and no inhibitory effects were observed on *E. coli* and *S. aureus* bacteria. In order to determine antioxidant capacities, DPPH and FRAP analyzes were applied and the highest antioxidant activity was observed as a result of FRAP, with 798.12 ± 14.18 mM Trolox/g extract in fraction of F₄. As a result of DPPH analysis, the highest activity was determined as 70.13 ± 0.38 mM Trolox/g extract in F₃ fraction. The percentage of fractions inhibiting ACE enzyme was found to be quite high in F₁ and F₂ fractions (with 100% inhibition). In addition, the smallest IC₅₀ value was observed in the F₂ fraction with 1.00 mg/mL. IC₅₀ values of other fractions were determined from small to large F₃ (IC₅₀ = 3.22 mg/mL), F₁ (IC₅₀ = 7.96 mg/mL) and F₄ (IC₅₀ = 141.64 mg/mL). The lowest inhibitory effect was seen in F₄ fraction with the highest IC₅₀ value.

Keywords: Ripened Kars Kashar cheese, bioactive peptide, ACE inhibitory effect, antioxidant activity, antibacterial activity.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Gıdaların tedavi edici gücüne olan inanış, nesillerdir geniş çapta kabul gören bir felsefe olmuştur. Fonksiyonel gıda hareketini başlatan kişi olmamasına rağmen Hipokrat, 2,500 yıl önce “Gıdanız ilacınız, ilacınız gıdanız olsun.” sözlerini dile getirerek gıdaların sağlık için önemini açıkça vurgulamıştır. Günümüzde de gıda ve gıda bileşenlerinin sağlığı etkileme yeteneklerine olan inanç, hızlı bir şekilde artmış olsa da yapılan bilimsel çalışmalar bu inançlardan bazılarını doğrulamamaktadır (Meyer, 1998). Tüketicinin gıda arzına olan güveni yüksek kalırsa, beslenme alışkanlıklarını değiştirmeye ilgili prensipler veya riskler hakkında bilinçli kararlar vermeleri için gerçeklere dayanan ve güvenilir bilgiler almaları önemlidir (Milner, 1999).

“Fonksiyonel gıda” ifadesi ilk olarak 1984 yılında Japonya’da, yararlı fizyolojik etkilere sahip bileşenlerle zenginleştirilmiş gıda ürünlerini tanımlamak için kullanılmıştır (Hardy, 2000; Kwak ve Jukes, 2001). Fonksiyonel gıdalar vücut koşullarını iyileştirme, bazı hastalıkları önleme veya bu hastalıkların riskini azaltma ve de iyileştirme gibi çeşitli amaçlar için kullanılabilir (Mark-Herbert, 2004; Menrad, 2003; Side, 2006).

Özellikle son yıllarda oldukça ilgi uyandıran ve birden fazla faydalı etkiye sahip gıda kaynaklı biyoaktif proteinler ve hidrolizatları hakkında pek çok araştırma yapılmıştır. Bu protein hidrolizalarının ve peptitlerin farmasötiklere kıyasla etkileri daha az olsa da dokularda birikme ve yan etki oluşturma olasılıkları da olabildiğince düşüktür (Mine ve ark., 2010).

Bu çalışmada, Kars yöresinden temin edilen olgunlaştırılmış kaşar peynirine suda çözünür özütlenme ve sonrasında enzimatik hidroliz işlemi uygulanmıştır. Elde edilen özütler ultrafiltre edilerek peptit fraksiyonları oluşturulmuştur. Fraksiyonlar ADE inhibisyon yeteneği, antioksidan aktivite ve antibakteriyel aktivite gibi çeşitli biyoaktif özellikler bakımından incelenmiştir.

Kaşar peynirinin antibakteriyel aktivitesine bakıldığında uygulanan iki farklı antimikrobiyel analiz (disk difüzyonu ve MİK) yönteminde de iki bakterinin üremesini inhibe eden bir aktivite gözlenmemiştir.

Olgun kaşar peynirin fraksiyonlarının antioksidan miktarlarına bakıldığında DPPH yöntemine göre en yüksek serbest radikal giderici etki F₃ fraksiyonunda (70.13 ± 0.38 mMol Trolox/g ekstrakt), en düşük etki ise F₄ (63.02 ± 0.25 mMol Trolox/g ekstrakt) fraksiyonunda elde edilmiştir. FRAP yönteminde indirgeme gücü en yüksek olan fraksiyon, F₄ (798.12 ± 14.18 mM Trolox/g ekstrakt) olmuştur.

Enzim inhibisyonu çalışmalarında, tüm fraksiyonlar arasından %100'e kadar yükselen inhibisyon değerleri ile en yüksek inhibisyon yüzdesi F₁ ve F₂ fraksiyonlarında görülmüştür. En düşük inhibisyon yüzdesine sahip fraksiyon ise tüm konsantrasyonları ile F₃ olarak bulunmuştur. Hesaplanan IC₅₀ değerlerine bakıldığında en düşük IC₅₀ ve dolayısıyla en yüksek inhibitör etkinliğine sahip fraksiyon F₂ (IC₅₀=1.00 mg/mL) olurken, en yüksek IC₅₀ ve dolayısıyla en düşük etkinliğe sahip fraksiyon ise F₄ (IC₅₀= 141.64 mg/mL) olmuştur.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarında yol gösteren, karşılaştığım her türlü soruna karşı çözüm yolu bulmamda yardımlarını esirgemeyen, manevi desteğini her zaman en içten şekilde hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK'e teşekkür ederim.

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Serkan SELLİ ve Doç. Dr. Aysun ŞENER GEDÜK'e, tez çalışmalarımın örnek kurutma ve enzim inhibisyonu aşamalarında bana laboratuvarını açan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e ve Arş. Gör. Fatıma Masume USLU'ya, antibakteriyel analizlerim sırasında bana yardımcı olan Aslıhan BÜĞÜLÜ'ye ve laboratuvarı kullanmamda yardımcı olan Arş. Gör. Bilal AĞIRMAN'a, kaşar peynirinin temininde yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Nuray GÜZELER'e;

Laboratuvar çalışmalarım için kullanmış olduğum saf suyu temin etmemde yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Serkan PEHLİVAN ve Dr. Tange Denis ACHIRI'ye;

Manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Gıda Yüksek Mühendisi Betül KILINÇLI, Nalan DEMİRBAŞ, Vahap Aykut AKSOY ve Dr. Öğr. Üyesi Asghar AMANPOUR'a;

Çalışmama maddi destek sağlayan Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Tüm hayatım ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, ilgi, sabır ve manevi desteklerinden ötürü annem, babam ve kardeşlerime;

İçtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
KISALTMALAR.....	XIV
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Biyoaktif Peptitler.....	5
2.2. Peptit Kaynakları	6
2.3. Biyoaktif Peptitlerin Eldesi.....	7
2.3.1. Fermantasyon	7
2.3.2. Enzimatik Hidroliz.....	10
2.3.3. Gastrointestinal Sindirim (<i>in vivo</i>)	12
2.4. Biyoaktif Peptitlerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	13
2.4.1 Antihipertansif Etki	13
2.4.2 Antioksidan Aktivite	19
2.4.3 Antimikrobiyel Aktivite	23
2.4.4 Antitrombotik Etki	27
2.4.5 Antikanserojen Etki.....	29
2.4.6. Antidiyabetik Etki	32
2.5. Kars Kaşar Peyniri ve Üretimi.....	35
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Peynir	39

3.1.2. Kimyasal Maddeler	39
3.1.3. Mikroorganizma.....	39
3.1.4. Araç ve Gereçler	39
3.2. Metot.....	43
3.2.1. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinde Suda Çözünür Özüt Eldesi	43
3.2.1.1. Peynirden Suda Çözünür Özütlerin Elde Edilmesi ve Yağların Uzaklaştırılması	43
3.2.1.2. Suda Çözünür Özütlerden Tuz ve Laktik Asitlerin Uzaklaştırılması	43
3.2.2. Enzimatik Hidroliz.....	45
3.2.3. Peptitlerin Fraksiyonlarına Ayrılması	45
3.2.4. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibisyonunun Belirlenmesi	45
3.2.5. Peptitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
3.2.5.1. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılacak Mikroorganizmalar	46
3.2.5.2. Tek koloni Eldesi	46
3.2.5.3. Disk Difüzyonu Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	46
3.2.5.4. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	47
3.2.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi.....	47
3.2.6.1. DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	47
3.2.6.2. FRAP Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	47

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	49
4.1 Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinden Elde Edilen Peptit Fraksiyonlarının Antibakteriyel Aktivitesi	49
4.1.1. Disk Difüzyonu ve MİK Yöntemleriyle Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	49
4.2. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinden Elde Edilen Peptit Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	53
4.3. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peyniri Peptit Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	55
5. SONUÇLAR.....	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	95
EKLER.....	96



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peyniri Peptit Fraksiyonlarının Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları.....	50
Çizelge 4.2. Peptit Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	53
Çizelge 4.3. Fraksiyonların konsantrasyonlarına göre ADE inhibisyon yüzdeleri	55
Çizelge 4.4. Fraksiyonların IC ₅₀ değerleri	56



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Absorbans ölçümlerinde kullanılan spektrofotometre	40
Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan santrifüj cihazı.....	40
Şekil 3.3. Özütleme işlemleri sırasında kullanılan inkübatör.....	41
Şekil 3.4. Fraksiyonlama işlemi için kullanılan ultrafiltrasyon düzeneği	41
Şekil 3.5. Dondurarak kurutma işlemleri için kullanılan liyofilizatör	42
Şekil 3.6. ADE inhibisyonunda kullanılan mikrolaka okuyucu.....	42
Şekil 3.7. Kaşar peynirinden peptit fraksiyonlarının eldesi ve fraksiyonlarla yapılan biyoaktivite çalışmaları.	44



KISALTMALAR

kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
M	: Molar
mMol	: Milimolar
μ Mol	: Mikromolar
L	: Litre
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
ADE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
°C	: Santigrat derece
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
mm	: Milimetre
U	: Ünite
DPPH	: Difenil-1-pikrilhidrazil serbest radikal giderici kapasite
FRAP	: Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç
TE	: Trolox eşdeğeri
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini %50 inhibe etmek için gereken fraksiyon miktarı
nm	: Nanometre
TPTZ	: 2,4,6-tripridil-s-triazin



1. GİRİŞ

Gıdalardaki önemli makrobesinlerden olan peptitler ve proteinler, protein sentezi için gereken hammaddeleri sağlaması ve temel enerji kaynağı olması sebebiyle büyük öneme sahiptir (Walther ve Sieber, 2011; Dziuba ve Dziuba, 2014). Gıdaların işlenmesi ve depolanması esnasında gerçekleşen karmaşık organik dönüşüm serisinin birer parçasını oluşturmaktadır. Besin değerlerinin yanı sıra bu protein ve peptitler, birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip olmaktadır (Hartmann ve Meisel, 2007; Moller ve ark., 2008).

Biyoaktif peptitler, amid ya da peptit bağları olarak da bilinen kovalent bağlarla bağlanmış amino asitlerden oluşan organik maddelerdir (Sánchez ve ark., 2017). Vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olan ve sağlığı etkileyebilen belirli protein parçaları olarak da tanımlanabilmektedir (Kitts ve Weiler, 2003). Hormon veya morfin benzeri etki gösterebilen, antimikrobiyel, antitromboz, antihipertansif, immünmodülatör, mineral bağlayıcı ve antioksidatif olarak kendi etki tarzlarına göre sınıflandırılabilir (Sánchez ve ark, 2017).

Proteinlerin, fizyolojik aktif bileşenler olarak diyetlerdeki rolü gittikçe artmaktadır. Gıdalarda doğal olarak bulunan birçok protein, fizyolojik etkisini doğrudan ya da *in vivo/in vitro* enzimatik hidroliz sonrasında göstermektedir. Diyetlerle birlikte alınan proteinlerin oldukça zengin aktif peptit kaynağı olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile anlaşılmıştır. Bu peptitler, bulunduğu ana protein dizisi içinde aktivite gösterememekte ve proteinlerin proteolitik enzimlerce hidrolizi sonucu aktif hale gelmektedirler. Hidroliz üç farklı şekilde gerçekleşmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2006):

- (1) Sindirim enzimleri ile,
- (2) Proteolitik mikroorganizmalarla,
- (3) Mikrobiyel veya bitkisel proteolitik enzimlerle.

Peynirler üzerinde yapılan çalışmalarda Çedar (Ong ve Shah, 2008), Mozzarella (De Simone ve ark., 2009), İsviçre peyniri (Bütikofer ve ark., 2008), keçi, koyun (Silva ve ark., 2006) ve Gouda peyniri (Saito ve ark., 2000) gibi bazı peynir çeşitlerinin biyoaktif peptit içerdiği ve bu peptitlerin de sitomodülatör, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyon aktivite ve antioksidan etki gibi çeşitli özellikler gösterdiği gözlenmiştir. ADE enzimi kan damarlarının büzülmesine neden olarak tansiyonun yükselmesinde rol oynayan bir enzimdir. ADE inhibitörü peptitler, Çedar, İsviçre, koyun, Gouda ve keçi peynirlerinden izole edilirken (Saito ve ark., 2000, Silva ve ark., 2006, Bütikofer ve ark., 2008), antioksidan peptitler keçi ve koyun peynirlerinden izole edilmiştir (Silva ve ark., 2006).

Son yıllardaki araştırmalar, dünyadaki yetişkin insan nüfusunun % 20'sinin hipertansiyon, inme, koroner kalp hastalığı, böbrek fonksiyon bozukluğu ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıklardan muzdarip olduğunu göstermektedir. ADE, çeşitli peptit substratlarının C-terminal uçlarından dipeptitleri açığa çıkaran bir ekzopeptidazdır (Schanbacher ve ark., 1998; Pihlanto, 2001) ve Anjiyotensin I'in (dekapeptit) kan basıncını artıran güçlü vazokonstriktör Anjiyotensin II'ye (oktapeptit) dönüşümünü katalizler. Antihipertansif peptitler, enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona sebep olmakta dolayısıyla da kan basıncını düşürmektedir (Kannan ve ark., 2010; Hartmann ve Meisel, 2007). Böylece ADE inhibe edici peptitlerin kullanımı, kan basıncını düşürerek faydalı etki sunmaktadır (Kamran ve ark., 2016).

ADE inhibitör etkisine sahip peptitlerin oluşumunda ve aktif hale gelmesinde sindirim sistemi enzimlerinin yanı sıra *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) gibi laktik asit bakterileri de etkili olmaktadır. Bu bakteriler tarafından sütün fermentasyonu sırasında kazeinin enzimlerce hidrolizi ile elde edilen ve ADE inhibitör etki gösteren peptitlerin, fermentasyonun ileri basamaklarında ortaya çıktığı belirtilmiştir (Korhonen ve ark., 1998; Silva ve Maccata, 2005). Çeşitli besinlerden, ADE enzimini inhibe edebilen birkaç tripeptit izole edilmiştir. Bunlar

arasından, *L. helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* yardımıyla fermente edilmiş ekşi sütün izole edilen (Moller ve ark., 2008) Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro'nun, hipertansif hastalarda kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir (Tuomilehto ve ark., 2004).

Özellikle peynir olgunlaşması sırasında ortaya çıkan, en çok da Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim inhibitörü (ADE) etkisine sahip peptit fraksiyonlarının biyoaktivitesini tanımlayan çalışmalar yapılmış (Matchar ve ark., 2008) ve çalışmaların sonucunda ADE inhibe edici peptitlerin, etkili birer fonksiyonel gıda maddesi olarak kullanılabileceği ve antihipertansif ilaçlara doğal bir alternatif sunabileceği belirlenmiştir. Bu peptitlerin olgunlaştırılmış peynirde tanımlanmasına, genellikle bir fraksiyonlama stratejisi yoluyla yaklaşılmıştır (Li ve ark., 2004).

Bu çalışmanın amacı, olgunlaştırılmış Kars kaşar peynirindeki proteinleri suda çözünür özütleme ve daha sonra enzimatik hidroliz işlemlerine tabi tutup, ultrafiltrasyon metodu ile iki farklı (5 kDa ve 10 kDa) molekül ağırlığına sahip peptit fraksiyonları oluşturmak ve elde edilen fraksiyonların antioksidan aktivite, ADE enzimini inhibe edici etki ile antibakteriyel etki gibi çeşitli biyoaktif özelliklerini araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif peptitler, azot ve amino asit kaynağı olmanın yanı sıra vücutta; opioid, immünmodülatör, antibakteriyel, antitrombotik ve antihipertansif etki gibi sayısız işleve sahip olan protein parçalarıdır (Murray ve FitzGerald, 2007). Biyolojik aktifliğe sahip peptitlerin bazıları birden fazla farklı etki de gösterebilmektedir (Meisel, 2004). Bu peptitler bulundukları protein dizisi içerisinde aktif değilken, gastrointestinal sindirim sırasında veya gıda işleme yöntemleri gibi çeşitli işlemler sonucunda aktif hale gelmektedir. Canlı organizmaların metabolik işlevleri üzerinde ve dolayısıyla insan sağlığında önemli roller üstlenmektedir (Singh ve ark., 2014).

Biyoaktif peptitler, hücrede büyük prepeptitler halinde sentezlenen proteinlerdir ve enzimatik hidroliz sonucu biyoaktif özellik gösterirler. Sinyal molekülleri olarak, çeşitli işlevlerde ve patojenezde önemli görevler üstlenirler (Sharma ve ark., 2011). Kimyasal yapıları, amino asit sekansları, hidrofobik özellikleri bu proteinlerin fonksiyonel davranışlarının ve biyoaktivite düzeylerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Nasri ve Nasri, 2013).

Biyoaktif peptitler üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda artmış ve peptitler, geniş bir şekilde gözden geçirilmiştir (Tirelli ve ark., 1997; Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2003). Biyoaktif peptitlerin sağlıklı beslenmeye katkıda bulunma potansiyeli, bilim dünyasında geniş bir şekilde tartışılmış, sağlık üzerinde farklı etkiye sahip biyoaktif peptitlerin belirlenebilmesi için kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanmış ve geliştirilmiştir. Bununla birlikte, biyoaktif peptitlerin varsayılan bazı sağlık etkileri, insan üzerinde yapılan çalışmalar ile de ispatlanmıştır (Hartmann ve Meisel, 2007).

2.2. Peptit Kaynakları

Biyoaktif peptitler, yapılan çok sayıda çalışma sonucunda yumurta, balık, et ve kan gibi hayvansal proteinlerden özellikle de süt proteini olan kazeinden elde edilmiştir. Hayvansal ürünlerin yanı sıra, pek çok araştırmacı tarafından bitki temelli gıda ürünleri üzerinde de çalışmalar yapılmış ve biyoaktif özelliğe sahip peptitler elde edilmiştir (Di Bernardini ve ark., 2011). Bitki kaynaklı peptitlerin de tanımlanması ile hayvansal ürünlerle birlikte sağlıklı ve dengeli diyetlerde sebzelerin kullanılabilmesi bilim camiasının ve kamuoyunun sebzelere ve bu tarz bitkisel ürünlere olan ilgisini arttırmıştır. Dünyanın protein ihtiyacının yarısını karşılayan tahıl ve baklagiller, bu araştırmaların temelini oluşturan zengin peptit kaynakları olarak nitelendirilmiştir (García ve ark., 2013; Malaguti ve ark., 2014).

Hayvansal proteinlerden peptit elde etmek için yapılan araştırmalarda kanın, önemli ve umut verici bir kaynak oluşturduğu belirlenmiş, serum albumininin, farklı tripsin konsantrasyonları kullanılarak hidroliz edilmesiyle oluşan hidrolizatlardaki peptit sekanslarının ADE inhibitörü, antidiyabetik ve antioksidan etki gibi farklı aktiviteler gösterdiği çalışmalarla bildirilmiştir (Arrutia ve ark., 2016).

Bunların yanında yumurta da gıda ve tıp endüstrisinde kullanılabilecek birçok biyoaktif peptidin kaynağı arasında yer almıştır (Wu ve ark., 2010; Zambrowicz ve ark., 2011; Bhat ve ark., 2015). *In vitro* ve *in vivo* ortamda yapılan çalışmalar ile yumurta proteinlerinden salınan biyoaktif peptitler tanımlanarak karakterizasyonları yapılmıştır. Sonuçlar yumurtayı, hastalıkların tedavisi ve önlenmesi için fayda sağlayan fonksiyonel gıdaların gelişimi için yeni bir biyolojik aktif madde kaynağı olarak değiştirmeye katkıda bulunmuştur (Bhat ve ark., 2015). Yumurta beyazında bulunan proteinlerden elde edilen Arg-Val-Pro-Ser-Leu peptidi kimyasal olarak sentezlenmiş ve ADE inhibitör aktivitesi göstermiştir (Yu ve ark., 2011).

Et ve balıktan elde edilen çeşitli peptitlerin de, antioksidan, antimikrobiyel, ve antihipertansif etki gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinin olduğu çalışmalarla

kanıtlanmıştır (Ryan ve ark., 2011; Lafarga ve ark., 2014; Mora ve ark., 2014; Liu ve ark., 2016; Ryder ve ark., 2016). Bugüne kadar, kurutma ve fermantasyon işlemleri sırasında et proteinlerinden çok sayıda peptit salındığı bildirilmiştir. Özellikle, ADE inhibe edici biyoaktif peptitlerin üretimi için et proteinleri çok yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Jang ve Lee, 2005).

Sığır sütü, peyniri ve diğer süt ürünlerinin gastrointestinal sindirim, fermantasyon ve gıda işleme yöntemleri sonucu ortama salınan ve biyolojik olarak aktivite gösteren peptitlerin önemli birer kaynağını oluşturduğu belirlenmiştir. (Fitzgerald ve Meisel, 2003; Meisel ve Fitzgerald, 2003). Farklı peynir türleri ve fermente süt ürünlerinde, çeşitli aktivitelerde birçok peptit olduğu gözlenmiştir (Gobbetti ve ark., 2002; Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2003; Matar ve ark., 2003; Fitzgerald ve Murray 2006). Özellikle peynir olgunlaşması sırasında gerçekleşen ikincil proteolizin, biyoaktif peptitlerin oluşumuna neden olduğu ve biyoaktivitenin, peynirin olgunlaşma evresine bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Meisel ve ark., 1997).

2.3. Biyoaktif Peptitlerin Eldesi

Biyoaktif peptitler, fermantasyon, enzimatik hidroliz ve *in vivo* gastrointestinal sindirim yoluyla öncül proteinlerinden salınabilmektedir (Phelan ve ark., 2009).

2.3.1. Fermantasyon

Fermantasyon biyoaktif peptitler ve hidrolize proteinler üretmek için kullanılan oldukça etkili bir yöntemdir. Doğada ve sindirim sistemimizde bulunan, geniş ve yararlı bir bakteri grubu olan laktik asit bakterileri, bu yöntemle birlikte biyoaktif peptit üretimi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bakterilerin fermente ürünlerin hazırlanmasındaki rolleri sadece fizyolojik önemlerinden dolayı değil, aynı zamanda ürünlerin doku ve lezzet gelişimi üzerine etki etmelerinden kaynaklıdır (Savijoki ve ark., 2006). Fermantasyon işleminin, proteinlerin

mikrobiyel proteazlar tarafından çeşitli biyolojik aktivite gösteren peptitlere parçalanması sebebiyle oluşabilecek uzun süreli depolanabilirliğin yanı sıra gıdaların besin değerini arttırabileceğine inanılmaktadır (Rajapakse ve ark., 2005).

Biyoaktif peptitler, fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter ve starter olmayan bakteriler tarafından üretilmektedir. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* gibi laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bu sistem hücre duvarına bağlı bir proteinaz ve endopeptidazlar, aminopeptidazlar, tripeptidazlar ve dipeptidazları da içeren birçok farklı hücre içi peptidazdan oluşmaktadır (Christensen ve ark., 1999). Süt proteinlerinin mikrobiyel proteolizi ile ADE inhibe edici, immünomodülatör, antioksidan ve antimikrobiyel özellik gösteren peptitlerin üretildiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Gobbetti ve ark., 2004).

Geleneksel olarak doğu ülkelerinde tüketilen fermente soya ürünlerinin de ADE inhibe edici ve antihipertansif peptitlerin önemli bir kaynağı olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. “Cheonggukjang” olarak adlandırılan ve *Bacillus subtilis* CH-1023 kullanılarak soyanın fermentasyonu sonucu elde edilen bir Kore soya ürününde güçlü bir antihipertansif peptit tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Diğer ADE inhibe edici peptitler, soya püresi (Shin ve ark., 2001), soya sosu (Okamoto ve ark. 1995; Nakahara ve ark., 2010), natto, tempe (Gibbs ve ark., 2004) ve diğer fermente soya ürünlerinde tanımlanmıştır (Rho ve ark.. 2009; Li ve ark., 2009; Ibe ve ark., 2009).

Yamamoto ve ark (1999) *Lb. helveticus* CPN4 suşu kullanılarak fermente edilen yoğurt benzeri bir üründen ADE inhibe edici özellik gösteren bir dipeptit (Tyr-Pro) tanımlamışlardır. Bu peptit sekansının tüm büyük kazein fraksiyonlarında bulunduğunu ve fermentasyon sırasında konsantrasyonunun, üründe maksimum 8.1 mg/mL konsantrasyona ulaştığını belirlemişlerdir.

Fuglsang ve ark (2003) ADE inhibitör aktivitesine sahip fermente süt üretebilme kabiliyetleri bakımından, *L. lactis* ve *Lb. helveticus*'a ait toplam 26 tip

laktik asit bakterisini test etmişlerdir. Test edilen tüm suşlar, çeşitli miktarlarda ADE inhibitörü maddeler üretmiş ve suşlardan ikisi ise, peptit oluşumu ve yüksek ADE inhibisyonu ile iyi bir korelasyon göstermiştir.

Ashar ve Chand (2004) *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile fermente edilmiş sütten ADE inhibitör aktiviteye sahip bir peptit tanımlamışlardır. β -kazeinden elde edilen bu peptidin sekansının Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly Pro-Ile ve IC_{50} değerinin de 1.7 mg/mL olduğunu belirlemişlerdir.

Pihlanto ve ark (2010) tarafından süt fermantasyonu sırasında ADE inhibisyonunu geliştirme potansiyellerini araştırmak için toplam 25 *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* suşu kullanılmıştır. Seçilen suşların ADE inhibe edici potansiyelleri çeşitlilik göstermiş bunlar arasından yedi tanesinin en yüksek ADE inhibe edici aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Fermantasyon sırasında ADE inhibe edici aktivite gelişimi ve hidroliz derecesi ilişkili bulunmuştur. *Lactobacillus jensenii* (*Lb. Jensenii*) ile fermente edilen sütten elde edilen ADE inhibe edici bileşikler, ters faz HPLC ile izole edilmiş ve kütle spektrometresi ve amino asit sekans analizleri yapılarak tanımlanmıştır. Bu aktif bileşiklerin kazeinden elde edilen peptitler olduğu görülmüştür. *Lb. jensenii* ile fermente edilen sütün, spontan hipertansif sıçanların kan basıncında geçici bir düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir.

Kleekayai ve ark (2015) tarafından yapılan bir çalışmada antioksidan ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibe edici peptitler, iki farklı geleneksel Tayland fermente karides ezmesi olan Kapi Ta Dam (Kp-B6) ve Kapi Ta Deang'den (Kp-R6) izole edilmiştir. Her iki özütte de ağırlıklı olarak 500 Da'dan daha düşük kütleyle sahip bileşiklerin mevcut olduğu belirlenmiştir. Anyon değiştirme kromatografisi ve katı faz ekstraksiyonu (C18 matrisi) ile gerçekleştirilen fraksiyonlama işleminin ardından üç adet dipeptit tanımlanmıştır. Ser-Val ve Ile-Phe peptitlerinin sırasıyla 60.68 ± 1.06 ve 70.03 ± 1.45 μ M IC_{50} değerleri ile ADE önleyici aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Trp-Pro'nun ise yüksek radikal temizleme aktivitesine (EC_{50} 17.52 ± 0.46 μ M) sahip olduğu

görülmüştür. Çalışma ile Tayland geleneksel mayalanmış karides ezmelerinin ADE önleyici aktivite ve antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin potansiyel kaynakları olduğu gösterilmiştir.

Soleymanzadeh ve ark (2016) yaptıkları bir çalışma ile geleneksel fermente deve sütünden (Chal) çeşitli laktik asit bakterilerini izole ederek tanımlamayı ve bu isolatlar tarafından fermente edilen deve ve sığır sütünün antioksidan aktivitesini araştırmayı amaçlamışlardır. İran'ın farklı bölgelerinden Chal örnekleri alınmış ve bu örneklerden *Lactobacillus (L.) plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. kefir*, *L. gasser*, *L. paracasei*, *Leuconostoc (Leu.) lactis*, *Weissella (W.) cibaria* ve *Enterococcus (E.) faecium* bakterileri izole edilerek tanımlanmıştır. Hem deve hem de sığır sütü 24 saat boyunca bu suşlar tarafından fermente edilmiş ve fermente deve sütü, sığır sütüne kıyasla anlamlı derecede ($P < 0.05$) daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. *Leu. lactis* tarafından fermente edilen deve sütü, diğer suşlar tarafından fermente edilen numunelere kıyasla anlamlı derecede ($P < 0.05$) daha yüksek DPPH ($57.90 \pm 4.59 \mu\text{M}$) ve ABTS ($1484.35 \pm 128.20 \mu\text{M}$; $P < 0.05$) radikal süpürme aktivitesi göstermiştir.

2.3.2. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, proteinlerin fonksiyonel özelliklerini ve besin değerlerini artırmak amacıyla yaygın olarak uygulanan bir peptit elde etme yöntemidir (Calderón de la Barca ve ark., 2000; Moure ve ark., 2005; Yim ve Lee, 2000) ve biyoaktif peptitlerin elde edilmesinde, hızlı, güvenli ve kolay bir şekilde kontrol edilebilmesi yönüyle oldukça tercih edilmektedir. Proteinlerin fonksiyonel ve biyolojik özelliklerini geliştirmek ve ticari değeri düşük olan yan ürünlere değer katmak amacıyla kullanılabilmektedir. Proteinlerin enzimatik hidrolizinde görev alan proteazlar, proteinlerdeki peptit bağlarına etki ederek onların hidrolizini katalizler ve genellikle substratlarındaki parçalanmış bağları çevreleyen amino asit dizilerine göre belirli bir özgüllük derecesine sahiptirler.

Peptit bağlarının hidroliz ile parçalanması, gelişmiş çözünürlükle sonuçlanan serbest amino ve karboksil gruplarının sayılarını arttırmaktadır. Böylece hidroliz, çoğunlukla öncül proteinin yapısına ve elde edilen peptitlerin moleküler ağırlığına bağlı olan hidrofobikliği artırabilmekte veya azaltabilmektedir (Calderón de la Barca ve ark., 2000).

Birçok biyoaktif peptidin eldesinde çoğunlukla pepsin ve tripsin gibi gastrointestinal enzimler kullanılmıştır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü peptitler ve kalsiyum bağlayıcı fosfopeptitler, tripsin kullanılarak elde edilen peptitlere örnektir (FitzGerald ve ark., 2004; Gobbetti ve ark., 2004; Meisel ve FitzGerald, 2003; Vermeirssen ve ark., 2004; Yamamoto ve ark., 2003). Diğer sindirim enzimleri ve proteinazların farklı kombinasyonları (pepsin, alkalaz, kimotripsin, termolizin, pankreatin, bakteriyel ve fungal enzimler de dahil) da çeşitli proteinlerden biyoaktif özelliğe sahip peptitler elde etmek için kullanılmaktadır (Kilara ve Panyam, 2003; Korhonen ve Pihlanto, 2003).

Pihlanto-Leppala ve ark (1998) yoğurt ve ekşi süt üretiminde kullanılan çeşitli ticari süt starterleriyle yapılan fermentasyon esnasında peynir altı suyundan ve kazeinlerden ADE inhibe edici özelliğe sahip peptitlerin oluşma potansiyelini incelemişlerdir. Hidrolizatların hiçbirinde ADE önleyici aktivite gözlenmemiştir. Örneklerin daha sonra pepsin ve tripsin ile sindirilmesi sonucunda, α_{S1} -kazein ve β -kazeinden türetilmiş birkaç adet güçlü ADE inhibe edici peptit oluştuğu belirlenmiştir (Pihlanto-Leppala ve ark., 1998).

Yapılan bir çalışmada soya fasulyesi proteinleri olan β -konglisin ve glisinin enzimatik hidrolizinin ardından bu bileşiklerin antioksidan aktivitesinin arttığı ve bu artışın temel sebebinin hidroliz sonrası oluşan aktif amino asit R gruplarının olduğu tespit edilmiştir (Saito ve ark., 2003).

Wattanasiritham ve ark (2016) *Khao Dawk Mali* 105 pirinç kepeği proteinini, albümin (% 12.5), globulin (% 13.9), glutelin (% 70.8) ve prolamin (% 2.9) halinde fraksiyonlamış, doğal ve denatüre edilmiş pirinç kepeği proteini fraksiyonlarını, optimum koşullar altında papain ve tripsin enzimleri ile 3 saat

boyunca hidroliz etmişlerdir. Fraksiyonlar ve hidrolizatlar, ORAC testi ile antioksidan aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Tripsin ile hidrolize edilmiş denatüre albümin, 4.07 µmol'luk bir Trolox eşdeğeri (TE)/mg protein ORAC değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir.

Jin ve ark (2016) mısır gluten ununu alkalaz, flavourzyme, alkalaz+flavourzyme ve flavourzyme+alkalaz gibi farklı kombinasyonlar kullanarak hidrolize etmişlerdir. % 10'luk substrat konsantrasyonunda, alkalaz tarafından katalize edilen mısır proteini hidrolizatı, % 17.83'lük bir hidroliz derecesi ile flavourzyme'den (% 3.65) çok daha yüksek bir hidroliz derecesi göstermiştir. Alkalaz+flavourzyme tarafından katalize edilen hidrolizat ise oldukça yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir. Üç antioksidan peptit elde edilmiş ve bu peptitlerin sekansları Cys-Ser-Gln-Ala-Pro-Leu-Ala, Tyr-Pro-Lys-Leu-Ala-Pro-Asn-Glu ve Tyr-Pro-Gln-Leu-Leu-Pro-Asn-Glu şeklinde belirlenmiştir. Peptitler arasında Cys-Ser-Gln-Ala-Pro-Leu-Al en yüksek radikal uzaklaştırma aktivitesi göstermiştir. Çalışmanın sonucunda mısır proteini hidrolizatlarının doğal antioksidanlar olarak kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Abdel-Hamid ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışmada bufalo sütü, ADE inhibitörü aktivite ve antioksidan aktiviteye sahip peptitler açısından incelenmiştir. Bufaloların yağsız sütünden elde edilen bir retentat papain, pepsin ve tripsin kullanılarak hidrolize edilmiş, papain hidrolizatının en yüksek ADE önleyici aktivite ve radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

2.3.3. Gastrointestinal Sindirim (*in vivo*)

Gastrointestinal sindirim, gıda kaynaklı peptitlerin biyolojik aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olup, yeni aktif fragmanların oluşmasına neden olmaktadır (Dia ve ark., 2014; Martínez-Villaluenga ve ark., 2009). Bu aktif fragmanlar ve peptitler, pepsin, tripsin veya kimotripsin gibi sindirim enzimlerinin etkisiyle gastrointestinal sindirim sırasında *in vivo* salınmakta ve diyet proteinleri, midenin parietal hücreleri tarafından salgılanan hidroklorik asit (HCl) varlığında

denatürasyona uğramaktadır. Bu asit, pepsinojeni aktive ederek onu aktif formuna, pepsine dönüştürür. Pepsin, proteinleri amino asitlere metabolize eder. Antibakteriyel, immünomodülatör, antihipertansif ve opioid etki gösteren birkaç biyoaktif peptidin kazein ve/veya peynir altı suyu proteinlerinden gastrointestinal sindirim yoluyla salındığı bilinmektedir (Meisel ve FitzGerald, 2003; Yamamoto ve ark., 2003; FitzGerald ve ark., 2004; Gobbetti ve ark., 2002; Gobbetti ve ark., 2004).

Alkalaz, termolizin gibi proteolitik enzimler, gastrointestinal sindirimi simüle etmek için pepsin ve tripsin ile birlikte kullanılabilir. Kazeinofosfopeptitler de dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif peptitleri serbest bırakmak için yapılan çalışmalarda da kullanılmışlardır (McDonagh ve FitzGerald, 1998).

Sindirilen gıda proteinleri, gastrointestinal sindirimin bütün basamaklarında di- veya tri-peptitler olarak hidrolize edilmektedir (Gardner, 1988). Gerçekleşen sindirim sonucunda meydana gelen peptitler biyolojik açıdan farklı işlevler göstererek sağlığı olumlu etkileme potansiyeli tespit edilmiştir. Özellikle süt ürünleri üzerinde yapılan birçok çalışma, bu ürünlerin biyoaktif peptitler açısından zengin birer kaynak olduğunu göstermekle birlikte, süt proteinlerinin sindirim sistemi boyunca enzimatik hidrolize karşı direnci konusundaki veriler sınırlı ve çelişkilidir (Meisel ve Schlimme, 1990; Meisel, 1997; Korhonen ve Pihlanto, 2006; Hernández-Ledesma ve ark., 2005; Hernández-Ledesma ve ark., 2006).

2.4. Biyoaktif Peptitlerin Sağlık Üzerine Etkileri

2.4.1 Antihipertansif Etki

Hipertansiyon, dünya nüfusunun yaklaşık ¼'üne etki eden, kardiyovasküler rahatsızlıklar üzerinde önemli bir etkiye sahip olan, kontrol edilebilir bir risk faktörüdür. Anjiotensin I-dönüştürücü enzim (ADE; EC 3.4.15.1), çeşitli peptit substratlarının C-terminal uçlarından dipeptitleri açığa çıkaran bir ekzopeptidazdır

(Schanbacher ve ark., 1998; Pihlanto, 2001) ve periferik kan basıncını düzenleyen renin-anjiyotensin sistemi ile yakından ilişkilendirilir (Meisel ve ark., 1997). Hipertansiyon, çoğunlukla renin-anjiyotensin sistemi ile düzenlenmektedir ve ADE, anjiotensinojen'den açığa çıkan anjiyotensin I'ın kuvvetli damar daraltıcı anjiyotensin II'ye dönüşümünü renin ile katalizleyerek kan basıncını yükseltmektedir. Ayrıca kan basıncında etkili bir faktör olan elektrolit dengesi de ADE ile ilişkilidir (Kınık ve Akbulut, 1994).

ADE, klorür ile aktive olan ve geniş bir *in vitro* substrat özgüllüğüne sahip bir çinko metalopeptidazıdır (Erdos ve Skidgel, 1987). Alternatif inisiyasyon alanlarında tek bir genden kopyalanan iki farklı izoformda, yani somatik ve küçük testiküler şeklinde bulunur (Kumar ve ark., 1991). Renin-anjiyotensin sisteminde, kan basıncının düzenlenmesinde ve kardiyovasküler fonksiyonda önemli roller üstlenmektedir. Aynı zamanda kallikrein-kinin sisteminde kan basıncını düşüren bir nonapeptit olan bradikininin parçalanmasını katalize eden çok işlevli bir enzimdir (Johnston, 1992; Erdos ve Skidgel, 1987). Dahası, ADE'nin, kardiyovasküler sistemle etkileşime girebilecek, nörotensin ve enkefalin içeren nöropeptitlerin yapısını da bozduğu gözlenmiştir (Wyvratt ve Patchet, 1985). ADE inhibisyonunun ise, hipertansiyon tedavisinde yararlı bir terapötik yaklaşım olduğu düşünülmektedir ve bu nedenle, yüksek tansiyon kontrolü ilaçlarının geliştirilmesinde ADE inhibisyonu önemli bir hedef haline gelmiştir.

ADE enzimini inhibe eden peptitler, potansiyel birer tansiyon düşürücü ajan olarak kabul edilmektedir (Kannan ve ark., 2012). Bundan dolayı, bitki ve hayvan temelli pek çok gıdadan antihipertansif etkiye sahip peptitlerin elde edilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır fakat ADE inhibisyonu üzerine *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalar arasında bir korelasyon görülebilmiştir (Miralles ve ark., 2018).

ADE inhibitörleri ilk olarak yılan zehrinden elde edilmiş (Ondetti ve ark., 1971), daha sonra sığır kazeini, zein, jelatin, maya ve mısır gibi farklı gıda ürünlerinden elde edilen peptitlerden ve enzimatik hidrolizatlardan çeşitli ADE

inhibitörleri keşfedilmiştir. (Ariyoshi, 1993; Yamamoto, 1997). Literatürde bilinen gıda proteini kaynaklı ADE inhibe edici peptitlerin çoğu, on amino asitlik kalıntıdan daha az olan küçük peptitlerdir (Meisel ve ark., 2006). Kısa sekanslarından dolayı bu peptitler, ADE enzimi ile etkili bir şekilde bağlanabilmek için uygun amino asit kalıntılarına sahip doğrusal yapılar olarak bulunmaktadır (Natesh ve ark., 2003; Bhuyan ve Mugesh, 2012) . ADE inhibe edici peptitlerin çoğu, prolin (P), fenil alanin (F), triptofan (W), tirozin (Y) ve arginin (R) gibi amino asitleri içermektedir ve bu amino asitlerin, peptidin C-terminalinin ilk 3 pozisyonunda, yapı-aktivite ilişkisine katkıda bulunması beklenmektedir (Wu ve ark., 2006). ADE'nin aktif bölge yapısı dikkate alındığında, C terminal amino asit kalıntılarının (P, F, K, W, Y ve R) aktif bölge ile çoklu temaslar oluşturması ve enzimin aktivitesini inhibe etmesi beklenmektedir (Kamran ve ark., 2016; Sagardia ve ark., 2013; Wu ve ark., 2006; Majumder ve Wu, 2010).

Angiotensin I dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörünün aktivitesi için, peptidin C-terminal kısmında prolin amino asidinin bulunması gerekmektedir. Örneğin β -kazein'nin mikrobiyel bir enzimle parçalanması sonucu elde edilen antihipertansiyon etkisine sahip bir biyoaktif peptit zinciri 7 amino asitten oluşmaktadır (Lys-Val-LeuPro-Val-Pro-Gln). Bu peptitte kuvvetli bir ADE inhibitör aktivitesi gözlenmezken, peptit zincirinden glisin (Gln) amino asidinin uzaklaştırılması sonucu oluşan 6 amino asit büyüklüğündeki peptidin kuvvetli bir ADE inhibitörü aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2000). Yapılan çalışmalarla 6 amino asitten oluşan bu peptidin, C-terminalinde bulunan prolin amino asidi ve amino asit zincirinin ADE inhibisyonunun gerçekleşmesi için etkili olabileceği belirlenmiştir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

Organizmada ADE inhibisyonu, kan basıncının düşmesine sebep olurken, aynı zamanda bağışıklık ve sinir sistemi aktivitesinde yer alan farklı düzenleyici sistemleri de etkileyebilir (Meisel ve ark., 1997). ADE'yi inhibe eden peptitler, gıda prosesleri sırasında inaktif prekürsör proteinlerden salınabilir. Özellikle fermantasyonun ADE'yi inhibe edici peptitlerin üretilmesi için başarılı bir strateji

olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin; *Lactobacillus helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* ile süt fermantasyonu sırasında kazeinden elde edilen iki güçlü ADE inhibe edici peptit, antihipertansif aktivite göstermiştir (Takano, 1998). Ayrıca *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suşları kullanılarak, ADE inhibe edici peptitler içeren mayalanmış sütler üretilmiştir. Bununla birlikte, Avrupa ticari fermantasyon ürünlerinde ADE inhibe edici peptitlerin bulunduğu bildirilmektedir (Hernandez-Ledesma ve ark., 2004).

Haileselassie ve ark (1999) ticari ve *Lactobacillus casei* enzimleri kullanarak hazırladıkları peynirlerden elde edilmiş potansiyel antihipertansif peptitleri saflaştırmış ve tanımlamışlardır. Peynir örnekleri ilk olarak, Nötraz (1883.0 U/mL), *L. casei* enzimleri (aminopeptidaz aktivitesi 86.4 lösin aminopeptidaz U/g) ve Debitraz (22.0 lösin aminopeptidaz U/g) kombinasyonları kullanılarak hidroliz edilmiş, hidroliz edilen peynirlerin suda çözünür fraksiyonları bir Delta Pak C18 Kolonu üzerinde ters faz HPLC'ye tabi tutulmuştur. Saflaştırılan peptitlerin amino asit dizileri tanımlanmıştır. Nötraz ile hidrolizin ardından, β -kazeinin dizisine (YPFPGPI f 60-66) benzer bir diziye sahip olan β -kazomorfin bulunmuştur. Farklı enzim kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik sindirimin sonucunda oluşan peptitlerin tamamının aktif bölgelere sahip sekansları içerdiği gözlenmiş, bu aktif bölgelerin varlığının, peptitlerin antihipertansif özelliklere sahip olmasında önemli bir etken olabileceği düşünülmüştür.

Saito ve ark (2000) yedi farklı olgunlaştırılmış peynir türünü (8 ay ve 24 ay olgunlaştırılmış Gouda, Emmental, Mavi küflü, Camembert, Edam, Havarti peynirleri) distile su yardımıyla homojenize etmiş ve suda çözünür peptitleri C-18 hidrofobik kromatografi kullanılarak hazırlamışlardır. Her bir peptit numunesinin oral olarak alımından önce ve sonra anjiyotensin I-dönüştürücü enzimi inhibe etme ve hipertansif sıçanlarda histolik kan basıncını azaltma gibi etkilerini ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda sistolik kan basıncındaki (-24.7 mm Hg) en güçlü depresif etki ve anjiyotensin I-dönüştürücü enzime karşı yoğun bir inhibe edici aktivite (% 75.7) 8 ay olgunlaştırılmış Gouda peynirinden elde edilen peptitlerde tespit

edilmiştir. Elde edilen dört peptit, ters faz HPLC ve jel filtrasyon yöntemleri ile izole edilmiş, kimyasal yapıları ve kökenleri (peptit A, Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln [α 1-casein (CN), B-8P; f 1–9]; peptit B, Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln (α 1-CN, B-8P; f1–13); peptit F, Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn(β -CN, A2-5P; f 60–68); ve peptit G, Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe (β -CN, A2-5P; f109–119)) kütle spektrometresi kombinasyonlarının analizleri ile netleştirilmiştir. Kimyasal olarak sentezlenen peptitler arasından A ve F, sıçanlarda az miktarda antihipertansif etkisi olan güçlü anjiyotensin I-dönüştürücü enzim inhibe edici aktivite göstermiştir.

Ryhanen ve ark (2001), ADE inhibe edici peptidlerin, peynirin olgunlaşması esnasında yavaş yavaş geliştiğini ve konsantrasyonlarının, 13 haftalık bir Gouda tipi peynirde en yüksek olduğunu ve bundan sonra yavaşça azaldığını tespit etmişlerdir. Öte yandan Saito ve ark. (2000), birkaç peynir çeşidinde ADE inhibe edici aktivite tespit etmiş ve iki yıl boyunca olgunlaştırılmış Gouda peynirinde en yüksek aktiviteyi ölçmüşlerdir.

Wu ve Ding (2002) ADE inhibitör etkiye sahip ve N- terminal ucunda karboksilik asit içeren iki adet soya peptidi tanımlamışlardır. Bu aktif ADE inhibitörü peptitlerin N- terminal kısmında ayrıca polar olmayan ve dallanmış amino asitlerin de bulunduğunu gözlemlemişlerdir. C-terminal kısmında W,Y,P ya da F amino asitlerini barındırmasının ADE inhibitör aktivite üzerinde etkili olabileceğini ifade etmişlerdir..

Maeda ve ark (2004) yaptıkları bir çalışma ile kefir tüketiminin kan basıncını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. SHRSP/Hos sıçanlarının serum ve torasik aortlarındaki ADE aktivitelerinin kefirle beslenen tüm gruplarda önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir.

Kuba ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada soya fasulyesi proteinleri (β -konglisin ve glisin), *Monascus purpureus* kaynaklı mikrobiyel asit proteinazı ile hidroliz edilerek ADE inhibe edici özelliklere sahip dört sekans (LAIPVNKP, LPHF, SPYP ve WL) izole edilmiştir. Bunlar arasında WL'nin en

aktif ADE inhibitörü olduğu bildirilmiş ve aktivitesinin, W, Y ve F aromatik amino asitlerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kodera ve Nio (2006) soya fasulyesi protein hidrolizatlarından beş adet peptit dizisi tanımlamış ve elde edilen peptitler arasından iki tanesinin (NWGPLV ($IC_{50}= 21\mu M$) ve PNNKPFQ ($IC_{50}= 33\mu M$)) oldukça yüksek ADE inhibitör aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde bu iki peptidin sahip olduğu prolin amino asitinin ve peptitlerin sekanslarının C-terminal ucundaki hidrofobik amino asitlerin varlığının, bu peptitlerin kuvvetli aktivitelerinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Lignitto ve ark (2010) Asiago peynirlerinden elde ettikleri suda çözünür özütlarin anjiyotensin-dönüştürücü enzimi (ADE) inhibe edici aktivitesini iki peynir üretim sisteminde ve farklı olgunlaşma sürelerinde incelemişlerdir. Peynir üretim sistemlerinin ADE inhibitör aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını ve de 6 aylık peynirlerin daha fazla olgunlaştırılmış olanlardan çok daha yüksek inhibe edici potansiyele sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Qureshi ve ark (2013) Gamalost ve Norvegia peynirlerinin anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ADE) inhibe edici aktivitesini, insan mide ve onikiparmak bağırsağı suları ile sindirimden önce ve sonra izlemişlerdir. Hem Gamalost hem Norvegia peynirlerinin, gastrointestinal sindirim sırasında ve Norvegia peynirinin, onikiparmak bağırsağı sindiriminin ardından artan bir ADE inhibe edici aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Ngo ve ark (2016) *Gadus macrocephalus* derisinden elde ettikleri jelatin özütünü çeşitli enzimler (pepsin, papain, a-kimotripsin, tripsin, nötraz ve alkalaz) kullanarak hidrolize etmişlerdir. Enzimatik hidroliz sonucunda pepsin hidrolizati, en güçlü ADE inhibe edici etki göstermiş ve hidrolizat ultrafiltrasyon membranları kullanılarak farklı molekül ağırlıklarında (<1, 1-5, 5-10 ve >10 kDa) fraksiyonlara ayrılmıştır. 1 kDa'nın altındaki peptik hidrolizatın, sırasıyla 6.9 ve 14.5 M IC_{50} değerlerine sahip iki güçlü ADE inhibitör peptidini (GASSGMPG (662 Da) ve LAYA (436 Da)) içerdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak *Gadus macrocephalus*

peptitlerinin, hipertansiyon ve bununla ilişkili hastalıkları önleyebilmek için fonksiyonel gıda bileşenleri olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Lin ve ark (2018) tarafından yapılan bir çalışmada Tibet sığırı sütünden elde edilen Qula kazeini iki farklı enzim kombinasyonu kullanılarak enzimatik hidrolize tabi tutulmuş ve elde edilen hidrolizatlar ADE enzimi üzerine inhibe edici etki açısından değerlendirilmiştir. Alkalaz+termolizin ve termolizin+proteinaz K kombinasyonları ile elde edilen hidrolizatlar, yüksek ADE inhibe edici aktivite göstermiştir (Lin ve ark., 2018).

2.4.2 Antioksidan Aktivite

Serbest radikaller aerobik organizmalarda, özellikle omurgalılarda ve insanlarda solunum sırasında vücutta meydana gelen çeşitli reaksiyonlarla üretilir (Evans ve ark., 2003; Je ve ark., 2007). Fizyolojik olarak üretilen serbest radikaller, sinyal verme ve enfeksiyonlara karşı savunma sağlama gibi çeşitli işlevler üstlenebilmektedir. Bununla birlikte, vücutta bulunan herhangi bir aşırı reaktif radikal miktarı, ateroskleroz, artrit, diyabet ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olan hücresel tahribatlara yol açabilir (Halliwell, 1994). Genel olarak reaktif türler, proteinlerde çeşitli hasarlara, DNA'da mutasyona, membran fosfolipitlerinin oksidasyonuna (Lee ve ark., 2004) ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde modifikasyona sebep olmaktadır (Alaiz ve ark., 1994). Normal koşullar altında antioksidan savunma sistemleri, reaktif türleri enzimatik (süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) ve enzimatik olmayan (antioksidan vitaminler, iz elementler, koenzimler ve kofaktörler) antioksidanlar yardımıyla uzaklaştırmaktadır (Johansen ve ark., 2005). Bununla birlikte, bazı durumlarda endojen savunma sistemi, vücudu kendi başına reaktif radikallere karşı koruyamamaktadır. Bu durum, oksidatif stresi ve zararlı etkilerini önleyebilen sentetik ve doğal antioksidanlara olan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır. Son yıllarda bilim dünyasında gıda kaynaklarından elde edilen ve yan etkisi neredeyse olmayan doğal antioksidanlara olan ilgi giderek artmaktadır (Kaneto ve ark.,1999).

Yapılan çeşitli araştırmalar ile birlikte, farklı gıdalardan elde edilen genellikle 5-16 amino asit büyüklüğünde (Chen ve ark., 1996) çok sayıda antioksidatif peptit belirlenmiştir (Nongonierma vd., 2015; Safitri vd., 2017). Bu peptitlerin düşük moleküler ağırlıklı, düşük maliyetli, yüksek aktiviteli, kolay emilimi olan, güvenli ve sağlıklı bileşikler olduğu düşünülmektedir. Enzimatik antioksidanlarla kıyaslandıklarında; daha basit yapıya sahip olmaları, farklı koşullar altında yüksek stabilite göstermeleri ve tehlikeli immün reaksiyonlara neden olmamaları gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Ayrıca, antioksidan aktivitelerinin yanı sıra besinsel ve fonksiyonel özellikler de sunmaktadır (Hattori ve ark., 1998; Xie ve ark., 2008) .

Yer fıstığı (Hwang ve ark., 2010), pirinç kepeği (Revilla ve ark., 2009), ay çiçeği proteini (Megías ve ark., 2008), süt kefir ve soya sütü kefir (Liu ve ark., 2005), yumurta sarısı proteini (Sakanaka ve Tachibana, 2006), kazein (Suetsuna ve ark., 2000), alg proteini (Sheih ve ark., 2009) gibi bitki ve hayvan kaynaklı ürünlerde bulunan antioksidanları araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır.

Süt kazeinleri (Cervato ve ark., 1999) ve mısır zeini (Wang ve ark., 1991) gibi birçok gıda proteininin antioksidan özelliklere sahip olduğu bulunmuş ve antioksidan aktivite gösteren peptitleri serbest bırakmak için gıda proteinlerinin hidrolizi gerçekleştirilmiştir (Chen ve ark., 1995; Park ve ark., 2001). Suetsuna ve ark (2000) ve Lopez-Exposito ve ark. (2007) yaptıkları çalışmalar ile α_{s1} ve κ -kazeinin peptik sindirimleri sonucu antioksidan aktivite gösteren peptitler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Wu ve ark (2005) geleneksel bir tavuk ürünü üzerinde yaptıkları çalışma ile ürünün çeşitli antioksidan özellikte peptitler içerdiğini kanıtlamışlardır. HVTEE ve PVPVEGV amino asit dizilimine sahip iki peptidi izole ederek tanımlamışlar ve model bir sistem kullanarak bu iki peptidin linoleik asidin otoksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Escudero ve ark (2013) kurutulmuş İspanyol jamponundan elde ettikleri 27 farklı peptit fraksiyonu arasından bazı anahtar peptitleri seçerek bu peptitleri

antioksidan aktivite açısından incelemişlerdir. En güçlü radikal temizleyici aktivite, 1.5 mg/mL konsantrasyonda %50 antioksidan aktivite gösteren SAGNPN peptidinde gözlenirken, elde edilen diğer peptitlerde daha düşük antioksidan aktivite belirlenmiştir.

Yan ve ark (2015) yeni antioksidan peptitler elde etmek amacıyla pirinç kalıntı proteinini hidrolize etmek için çoklu proteazlar ile muamele etmişlerdir. 0.25 mg/mL IC₅₀'ye sahip bir antioksidatif peptit fraksiyonunu (RRPB3), pirinç kalıntı proteini hidrolizatından membran ultrafiltrasyonunu takiben, boyut dışlama kromatografisi ve RP-HPLC'yi kullanarak saflaştırmışlardır. RRPB3'ün dört peptit (RRPB3 I-IV) içerdiği ve bunların amino asit dizilerinin RPNYTDA (835.9 Da), TSQLLSDQ (891.0 Da), TRTGDPFF (940.0 Da) ve NFHPQ (641.7 Da) olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu dört peptidi kimyasal olarak sentezlemiş ve antioksidan aktivitelerini sırasıyla DPPH radikal süpürme, ABTS radikal süpürme testi ve FRAP-Fe³⁺ azaltma deneyi ile tespit etmişlerdir. RRPB3 I (RPNYTDA) ve RRPB3 III (TRTGDPFF)'ün her ikisi, tek başına kullanılanların hepsine kıyasla sinerjik antioksidan aktivite göstermiştir. Elde edilen dört sentetik peptidin hepsi, simüle edilmiş gastrointestinal koruyuculara karşı oldukça iyi bir stabilite sergilemiştir.

Aguilar-Toalá ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus plantarum*'un çeşitli suşları kullanılarak fermente edilmiş sütteki peptit fraksiyonları çeşitli biyolojik aktiviteler açısından değerlendirilmiştir. *Lactobacillus plantarum* 55 suşu kullanılarak elde edilen özüt ve peptit fraksiyonlarının diğer suşlar kullanılarak elde edilenlere kıyasla yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

İbrahim ve ark (2018) deve sütü kazeini ve deve sütü peynir altı suyu proteinlerinden elde ettikleri peptit fraksiyonlarını antioksidan aktivite açısından incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, bu iki farklı kaynaktan elde edilen peptitlerin önemli birer serbest radikal giderici olduklarını ve dolayısıyla oksidatif stresle

ilişkilendirilen birçok hastalığın tedavi edilebilmesi için büyük potansiyele sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Liu ve ark (2018) tarafından yapılan bir çalışma ile fındık protein hidrolizatlarından antioksidan aktivite açısından değerlendirilmek üzere 6 adet peptit elde edilmiş ve bu peptitlerin amino asit sekansları belirlenmiştir. Elde edilen 6 peptidin tümünde de yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir. Sonuçlar fındık protein hidrolizatlarından elde edilen peptitlerin gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel antioksidanlar olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Timón ve ark (2018) inek sütü peyniri üzerine yaptıkları bir çalışma ile farklı kökenli (hayvan, bitki ve mikrobiyel) peynir mayası ilavesinin, antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin salınımı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Peynirden elde ettikleri suda çözünür özütlerin antioksidan aktivitesini, DPPH radikal temizleyici ve metal şelatlayıcı aktivite deneylerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Peptitleri (<3 kDa) RP-HPLC kullanarak fraksiyonlara ayırmışlar ve daha sonra potansiyel antioksidan aktiviteye sahip fraksiyonları, peptitlerin daha fazla tanımlanabilmesi için LC-MS/MS ile analiz etmişlerdir. Mikrobiyel peynir mayası ile oluşturulan peynir özütlerinin oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. (P <0.05). Özütlerden izole ettikleri dokuz fraksiyonun DPPH radikal temizleyici ve metal şelatlama aktiviteleri gösterdiğini bildirmişlerdir.

Zanutto-Elgui ve ark (2018) *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus flavipes*'in enzimlerinin proteolitik aktivitesine tabi tutulan sığır ve keçi sütünden, biyoaktif peptitler üretmeyi ve bu peptitlerin antioksidan aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Yapılan analiz sonucunda süt örneklerinde, % 92.5'e kadar DPPH inhibisyonu ve 52.5 µmol/mL Trolox eşdeğerinde ORAC stabilizasyonu gösteren peptitlerin varlığı tespit edilmiştir.

2.4.3 Antimikrobiyel Aktivite

Canlı organizmaların çoğu temas, yutma ve soluma yoluyla potansiyel olarak zararlı patojenlere maruz kalmaktadır (Hultmark, 2003; Barra ve Simmaco, 1995). Bu organizmaların mikroorganizmalara karşı hayatta kalabilmesi, çeşitli bileşenleri içeren bir savunma mekanizması ağına dayanmaktadır (Bals, 2000). Genellikle patojenik istila sırasında, ilk savunma hattı T ve B hücrelerinin spesifik antijenlere karşı aktivasyonunu içeren kazanılmış bağışıklık tepkilerini takiben doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarını içermektedir (Fearon ve Locksley, 1996; Medzhitov ve Janeway, 2000). Bu kazanılmış bağışıklık mekanizmalarının aksine, yapısal olarak ifade edilen veya indüklenen bazı endojen peptitler de patojenlere karşı hızlı ve etkili bir savunma aracı olarak görev almaktadır. Antimikrobiyel peptitler olarak adlandırılan bu molekül grubu, ilkel bir bağışıklık savunma mekanizması oluşturmakta ve insanlardan bitkilere ve böceklere kadar çok çeşitli ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır (Lehrer ve Ganz, 1999).

Antimikrobiyel peptitlerin işlevi, ökaryotik parazitlerin yanı sıra bakteri, mantar ve virüs dahil olmak üzere çok çeşitli patojenlere karşı inhibe edici etki göstermektedir. Bu peptitlerin aktivitesi, moleküler yapısından kaynaklı olup özelliklerine, yani peptit boyutuna, amino asit kompozisyonuna, yüke, hidrofobikliğe ve ikincil yapıya bağlıdır (Kannan ve ark., 2010; Shahidi ve Zhong, 2008). Antimikrobiyel peptitler, özellikle gıda proteinlerinin laktik asit bakterileri kullanılarak fermentasyonu sonucu elde edilenler, gıdaları korumak için katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Diğer koruyucu kimyasallarla karşılaştırıldığında bu peptitler daha az yan etki gösterir ve gıdanın organoleptik ve besin özelliklerini korur (Kamran, 2017; Gálvez ve ark., 2007).

Antimikrobiyel peptitler net yüklerine göre anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılabilir (Gálvez ve ark., 2007; Salampessy, 2010). Katyonik antimikrobiyel peptitler, hayvanlar ve bitkiler arasında geniş çapta dağılım gösteren antimikrobiyel peptit grubunu oluşturmaktadır (Vizioli ve Salzet, 2002). Bu peptitler, arginin (R), histidin (H) ve lisin (K) (Kamran ve ark., 2016; Hancock ve

Lehrer, 1998; Hancock, 2001) gibi pozitif yüklü amino asit kalıntıları bakımından zengindir ve şimdiye kadar tanımlanan antimikrobiyel peptitlerin çoğunluğunu oluştururlar. Anyonik özellikteki antimikrobiyel peptitler, aspartik asit (D) gibi negatif yüklü amino asit kalıntıları bakımından zengin olmalarıyla bilinirler (Lai ve ark., 2002). Bu antimikrobiyel peptitler katyonik olanlara kıyasla sayıca azdır (Kamran ve ark., 2016). Yapısal olarak antimikrobiyel peptitler α -heliks, β -pileli, uzatılmış ve döngülü peptitler olacak şekilde dört kategoride sınıflandırılmaktadır (Hancock ve Lehrer, 1998). Doğal olarak oluşan antimikrobiyel peptitler ağırlıklı olarak β -pileli ve α -heliks yapıdadır. Gıda proteinlerinden elde edilen antimikrobiyel peptitlerin çoğunun ikincil yapıları henüz belirlenmemiştir (Kamran ve ark., 2016).

Antimikrobiyel peptitler, birçok protein hidrolizatında, özellikle de sütte tanımlanmıştır. En çok çalışılan antimikrobiyel peptit laktoferrisindir ve sığır ile insan laktoferrininden elde edilmiştir (Kitts ve Weiler, 2003). Ayrıca α_{S1} -kazein ve α_{S2} -kazein'de de birkaç antibakteriyel peptit tanımlanmıştır (Rizzello ve ark., 2005) ve bu peptitlerin, bazı gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Staphylococcus*), mayalara ve filament mantarlara karşı etkili olduğu görülmüştür (FitzGerald ve Murray, 2006).

Hayes ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada, sodyum kazeinatın *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 ile fermantasyonu sonucunda *Enterobacter sakazakii* ATCC12868 ve *E. coli* DPC5063 gibi patojen suşlara karşı antibakteriyel etki gösteren üç adet peptit (IKHQGLPQE, VLNENLLR ve SDIPNPIGSENSEK) tanımlamışlardır.

Jang ve ark (2008) tarafından yapılan çalışmada farklı ticari enzimler (termolizin+proteinaz A, tripsin, proteinaz K, tirozinaz, pepsin, papain ve proteaz) kullanılarak, sığır sarkoplazmik proteinlerinden elde edilen peptitlerden Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln peptidinin *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Listeria monocytogenes* üzerine, Gly-Phe-His-Ile peptidinin *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) üzerine, Phe-His-

Gly peptidinin *P. aeruginosa* üzerine ve Asp-Phe-HisIle-Asn-Gly peptidinin *E. coli* üzerine antimikrobiyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Pritchard ve ark (2010) ticari olarak satılan üç Avustralya Çedar peynirinde antimikrobiyel peptitlerin varlığını araştırmışlardır. Peptit özütlerinin *E.coli*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'un üzerine antimikrobiyel etkileri incelenmiş ve bu üç peynirin peptit özütlerinin, tripton suyu içeren pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında *E. coli* ve *B. cereus*'u inhibe ettiği belirlenmiştir. Peynirler arasında ticari peynir A peptitlerinin, *Bacillus cereus*'a, ticari peynir C peptitlerinin ise *E. coli*'ye karşı oldukça büyük inhibisyon sergilediği gözlenmiştir. *S. aureus*'un inhibisyonu, üç peynir peptidi özütlerinin tümü için düşük bulunmuştur.

Singh ve ark (2015) soya sütünün *Lactobacillus plantarum* C2 suşu kullanılarak fermente edilmesi ile oluşan biyoaktif peptitlerin, antimikrobiyel aktivitelerini incelemişler ve *E. coli*, *S. dysenteriae*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* patojenlerine karşı oldukça yüksek antimikrobiyel aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Li ve ark (2016), *Xenopus laevis* derisinden anyonik özellikte küçük bir antimikrobiyel peptit (XLAsp-P1) izole etmişlerdir. Bu peptidin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ile meme kanseri hücrelerine karşı güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmada transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak, bu peptidin antimikrobiyel aktivitesinin hücre zarının yok edilmesine bağlı olduğu belirlenmiştir.

Osman ve ark (2016) keçi sütü peynir altı suyunu *Bacillus licheniformis* alkalazı yardımıyla hidrolize etmişlerdir. En yüksek hidroliz derecesine sahip olan hidrolizatı, boyut dışlama kromatografisi kullanarak fraksiyonlarına ayırmışlar ve elde edilen fraksiyonlar ve keçi sütü peyniraltı suyunun antibakteriyel aktivitesini disk difüzyonu yöntemi ile belirlemişlerdir. Sonuçlar, hidrolizatların, hidrolize edilmemiş keçi peynir altı suyuna kıyasla önemli ölçüde yüksek bir antibakteriyel aktivite sergilediğini göstermiştir.

Fontenele ve ark (2017) Brezilya'nın Ceará ve Jaguaribe bölgelerinden temin ettikleri Coalho peyniri proteinlerinin peptidazlarla muamelesi sonucu ürettikleri peptitleri, 28 fraksiyon verecek şekilde ters faz HPLC ile ayırmış, peptit sekanslama işleminin sonucunda da 116 farklı peptit tanımlamışlardır. Bu peptitlerin yetmiş dördünün β -kazein, , dördünün βA_2 -kazein, dördünün βA_3 -kazein, yirmi beşinin α_{S1} -kazein, beşinin α_{S2} -kazein ve dördünün κ -kazein kaynaklı olduğunu belirlemiş, bunlar arasından α_{S1} -kazein (1-23) fragmanının antimikrobiyel özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Pei ve ark (2017) atık Tibet öküzü sütünü, pepsin enzimi kullanarak hidroliz etmiş ve elde ettikleri protein hidrolizatlarını antimikrobiyel aktivite açısından incelemişlerdir. Antimikrobiyel özelliğe sahip iki adet peptit (Arg-Val-Met-PheLys-Trp-Ala ve Lys-Val-Ile-Ser-Met-Ile) belirlemişler ve bu iki peptitten Arg-Val-Met-Phe-Lys-Trp-Ala'nın, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Salmonella Paratyphi*'e karşı güçlü bir antimikrobiyel aktivite gösterdiğini belirlerken, Lys-Val-Ile-SerMet-Ile'nin yalnızca bakterilerin değil mantarların da gelişmesini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir.

Fialho ve ark (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, Canastra artesanal minas peyniri 30 günlük bir olgunlaştırma süresi boyunca antimikrobiyel peptitlerin varlığını gözlemek için değerlendirilmiştir. Peynirden elde edilen çözünür peptitler, ters faz sıvı kromatografisiyle fraksiyonlanmış ve fraksiyonlar *E. coli*'yi inhibe etme etkileri için değerlendirilmiştir. Antimikrobiyel aktivite içeren fraksiyonlar MALDI-TOF/TOF ile analiz edilmiş ve peptitler daha sonra MASCOT Daemon kullanılarak tanımlanmıştır. RPKHPIKHQ, RPKHPIKHQG, RPKHPIKHQGLPQ, RPKHPIKHQGLPQE, HQPHQPLPPT ve MHQPHQPLPPT peptitlerinin antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

2.4.4 Antitrombotik Etki

Kanın pıhtılaşması olayı, kapsamlı etkileşimler içeren bir dizi proteolitik reaksiyonla kontrol edilen kompleks bir fizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Davie ve ark., 1991; Furie ve Furie, 1988; Luchtman-Jones ve Broze, 2009). Trombin (EC 3.4.21.5), kan pıhtılaşması sırasında protrombinin proteolitik bölünmesi ile oluşan bir serin proteazıdır (Bode, 2006). Bir ağır ve bir hafif zincirin disülfid köprüsü yardımıyla kovalent olarak bağlanması ile oluşmaktadır.

Emboli kaynaklı kalp-damar hastalıkları, felç, koroner kalp hastalığı, miyokard enfarktüsü ve düzensiz anjini de içeren bir grup kalp ve damar rahatsızlıklarıdır (Yang ve ark., 2017; Rafiq ve ark., 2017). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Sabbione ve ark., 2016; Ye ve ark., 2015). 2015 yılında tüm küresel ölümlerin %31'inin (17.7 milyon) kardiyovasküler hastalıklar sonucunda meydana geldiği ve bu ölümlerin 7.4 milyonunun koroner kalp hastalığından kaynaklanırken, 6.7 milyonunun inme kaynaklı olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir (Anonim, 2019a). Her yıl kardiyovasküler rahatsızlıklardan ölenlerin sayısı, diğer rahatsızlıklardan ölenlerin sayısına kıyasla oldukça yüksektir.

Kanın pıhtılaşmasındaki anormallikler sonucu meydana gelen tromboz gelişme eğilimi kardiyovasküler hastalıklara sebep olan önemli bir etkidir. Artan tromboz oluşumu, trombosit hiperreaktivitesi, yüksek hemostatik protein seviyeleri (Örn., Fibrinojen), kusurlu fibrinoliz ve kanın hiperviskozitesi ile bağlantılıdır. Bu nedenle, antitrombotik ilaçlar, trombosit agregasyonunu azaltmak ve fibrinolizi arttırmak için yaygın olarak kullanılır (Jolles, 1975). Özellikle son zamanlarda yapılan çalışmalar ile birlikte, κ -kazeinin enzimatik hidrolizi sonucu meydana gelen ve antitrombotik özelliklere sahip birçok peptit olduğu belirlenmiştir (Chabance ve ark., 1995; Qian ve ark., 1995).

Yapılan çalışmalar, antitrombotik peptitlerin üretilmesinde en yaygın kullanılan yöntemin gıda proteinlerinin enzimatik olarak hidroliz edilmesi

olduğunu göstermektedir. Antitrombotik aktiviteye sahip peptitlerin 3 ila 20 amino asit büyüklüğünde olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2017).

Rojas-Ronquillo ve ark (2012) *Lactobacillus casei* Shirota ve *Streptococcus thermophilus* tarafından fermente edilen sığır kazeinlerinden antitrombotik özelliğe sahip peptitlerin salınımını tanımlamışlardır. *Lactobacillus casei* Shirota ile fermentasyonun ardından antitrombotik özelliğe sahip peptitlerin oluştuğu görülmüş ve en yüksek trombin inhibe edici aktivite, % 80.7 ile *Lb. casei* Shirota tarafından 27 saatlik fermentasyonun ardından gözlenmiştir.

Tu ve ark (2017), tarafından yapılan bir çalışmada kazein kaynaklı trombin inhibe edici özellikteki peptitler, tripsin ile *in silico* enzimatik sindirimde öngörülen ve Mascot analizi ile UPLC-Q-TOF-MS/MS ile tanımlanan dizilere dayalı biyoinformatikler ile taranmıştır. Trombin inhibe edici aktiviteye sahip toplam 35 yeni peptit tanımlanmış, bunlar arasından β -kazeinden türetilmiş FQSEEQQTEDELQDK, hirudin ile dikkate değer bir dizi benzerliği göstererek ve trombine karşı güçlü inhibe edici aktivite sergilemiştir.

Qiao ve ark (2018) su, tuz ve asitte çözünen *Mytilus edulis* proteini fraksiyonlarını elde ederek proteinlerin tripsin ile enzimatik hidrolizini gerçekleştirmiştir. Enzimatik hidroliz sonrasında peptitleri, UPLC-Q-TOF-MS/MS ile analiz etmiş ve 387 adet farklı peptit tanımlamışlardır. Su, tuz ve asitte çözünen *M. edulis* proteininden elde ettikleri bu peptitlerin antitrombotik aktivitelerini, 5 mg/mL'de sırasıyla % 40.17, % 85.74, % 82.00 olarak belirlemişlerdir.

Shimizu ve ark (2009) tarafından yapılan bir çalışmada domuz eti, papain ile enzimatik olarak hidroliz edilmiş ve elde edilen peptitlerin antitrombotik aktivitesi, *in vitro* olarak antikoagüle edilmemiş sıçan kanı kullanılarak bir trombosit fonksiyon testi ile değerlendirilmiştir. Ardından *in vivo* olarak sıçan karotis arter tromboz testi ile antitrombotik aktivite incelenmiştir. Saflaştırılmış peptit fraksiyonunun antitrombotik aktivitesinin, 50 mg/kg vücut ağırlığı'nda aspirinin antitrombotik aktivitesine eşit olduğu belirlenmiştir.

Khiari ve ark (2013), *Scomber scombrus*'un deri hidrolizatlarından elde edilen biyoaktif jelatin peptitlerin, trombosit agregasyonunu orta derecede antitrombotik aktiviteye karşılık gelen ve yaklaşık % 30 oranında önemli ölçüde inhibe edebildiklerini bildirmişlerdir.

2.4.5 Antikanserojen Etki

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasından kaynaklanan, milyonlarca insanı etkileyen ana ölüm nedenlerinden biridir (Ferlay ve ark., 2010). 2012 yılında yaklaşık olarak 14 milyon kanser vakası tespit edilmiş (Ferlay ve ark., 2013) 2015 yılına gelindiğinde kanserden ölenlerin sayısı 8.8 milyona ulaşmıştır. Akciğer, karaciğer, kolorektal, mide ve meme kanserleri en sık karşılaşılan ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Anonim 2019b). Yakın gelecekte kanserden kaynaklanan ölümlerin, kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölümleri geride bırakacağı beklenmektedir. Yılda yaklaşık 7 milyon insan kansere bağlı vakalardan ölmekte ve 2020 yılına kadar her yıl 16 milyondan fazla yeni kanser vakası ile karşılaşılacağı tahmin edilmektedir (Jemal ve ark., 2011). Kemoterapi, kanser hücrelerine sitotoksik bir ajan yollayarak kanseri tedavi etmede kullanılan en önemli tedavi yöntemlerinden biridir. Konvansiyonel kemoterapi ile ilgili temel problem, normal hücreleri etkilemeden doğru miktarda ilacı doğrudan kanser hücrelerine verememektir. İlaç direnci, farklı biyodağılım, biyotransformasyon ve ilaç klirensi de kemoterapinin yaygın problemleri arasına girmektedir (Kakde ve ark., 2011). Hedef odaklı kemoterapi ve kontrollü ilaç salınım teknikleri, bu tür problemleri aşmak için güçlü birer yöntem olarak ortaya çıkmaktadır (Enback ve Laakkonen, 2007; Zhang ve ark., 2012). Bu yöntemler, ilaçların sağlıklı hücreye erişimini kısıtlarken, önceden tanımlanmış hedeflerde (örneğin; kanserde aşırı ifadelenen reseptörler) seçici ve etkili bir şekilde lokalize edilmesine izin verecek ve böylece terapötik endeksi maksimize ederek toksisiteyi azaltacaktır.

Kanser tedavisi için kullanılan çeşitli ilaçların yanında bazı protein/peptit reseptörlerinin ve tümörle ilişkili peptitlerin ve proteinlerin keşfedilmesinin, yakın gelecekte kanser terapötik pazarının büyük payını yakalayan, daha etkili ve seçici anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesini sağlayacağı beklenmektedir (Enback ve Laakkonen, 2007; Aina ve ark., 2002; Vlieghe ve ark., 2010). Peptitlerin, küçük yapıda olmaları, sentez ve modifikasyonlarının kolaylığı, tümöre nüfuz etme yeteneği ve biyouyumluluğunun iyi olması, kansere karşı mücadelede önemli avantajlar oluşturmaktadır (Thayer, 2011; Borghouts ve ark., 2005).

Kampa ve ark (1996), T47D insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını, doza bağlı ve geri dönüşümlü bir şekilde inhibe edebilen Tyr-Val-Pro-Phe-Pro (f158-162) sekansına sahip α_{S1} -kazeinden izole edilen yeni bir kazomorfin pentapeptit tanımlamışlardır.

Kim ve ark (2000) yağsız soya fasulyesi proteinlerini termoaz enzimi ile hidroliz edip, katı faz ekstraksiyonu ve HPLC ile saflaştırarak bir hidrofobik nanopeptit (X-Met-Leu-Pro-Ser-Try-Ser-Pro-Try) elde etmişler ve yaklaşık 1 mg/mL'de, bu peptidin, fare monosit makrofaj hücre hatlarında G2/M evresindeki mitozu durdurduğunu belirlemişlerdir.

de Simone ve ark (2011) bufalo peynir altı suyundan izole ederek saflaştırdıkları ve F3 olarak adlandırdıkları bir peptit alt fraksiyonunun, kolon kanseri hücreleri üzerindeki inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda bu fraksiyonun kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını %30 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Li ve ark (2013) tarafından yapılan bir çalışma ile mısır peptitlerinin birincil antikanser etkisi, *in vitro* modeller kullanılarak gösterilmiştir. HepG2 hücreleri, mısır gluteninden ekstrakte edilen proteinin enzimatik hidrolizi ile elde edilen mısır peptitlerine maruz kaldığında apoptotik aktivitede bir artış olduğu gözlenmiştir.

Chi ve ark (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Tegillarca granosa* kasi protein hidrolizatından Trp-Pro-Pro ve Gln-Pro peptitleri izole edilmiştir. Bu

peptitlerden Trp-Pro-Pro'nun, PC-3, DU-145, H-1299 ve HeLa hücre hatlarına karşı doza bağlı olarak güçlü sitotoksik etki gösterdiği ve PC-3 hücrelerinin morfolojilerini önemli ölçüde değiştirdiği gözlenmiştir. Erken evre apoptotik PC-3 hücrelerinin yüzdesi, 24 saat boyunca sırasıyla 5 ve 15 mg/mL Trp-Pro-Pro konsantrasyonları ile muamele edildiğinde % 11.22'den % 22.78'e yükselmiştir. Böylece Trp-Pro-Pro'nun kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyerek kanser tedavisinde kullanılabileceği öngörülmüştür.

Jahanbani ve ark (2016) tarafından yapılan çalışmada pers ceviz tohumu proteini kimotripsin, tripsin ve proteinaz K enzimleri kullanılarak hidroliz edilmiştir. Ceviz proteini hidrolizatlarından elde edilen peptitler, insan meme (MDA-MB231) ve kolon (HT-29) kanser hücresi soylarının canlılığına karşı test edilmiştir. Peptit fraksiyonları ile muamele üzerine *in vitro* kanser hücresi canlılığını değerlendirmek için MTT [3-(4, dimetil tiyazolil)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür] yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre peptit fraksiyonları, meme kanseri hücreleri için 63 ± 1.73 ve kolon kanseri hücreleri için 51 ± 1.45 hücre büyümesi inhibisyonu göstermiştir.

Zhao ve ark (2016) sığır β -kazeinden elde edilen bir peptit olan PGIPN'nin insan yumurtalık kanseri hücreleri üzerine inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda peptidin kanser hücrelerini inhibe ettiğini ve bu etkinin peptidin dozuna bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma ile PGIPN'nin, insan yumurtalık tümörlerinin adjuvan tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olduğunu göstermişlerdir.

Ortiz-Martinez ve ark (2017) yaptıkları bir çalışmada mısır peptitlerinin HepG2 hücreleri üzerine önemli dercede antikanser etkilerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Normal mısırdan elde edilen albümin-alkalaz hidrolizatlarından izole edilmiş peptit fraksiyonlarının, kaliteli protein mısırdan elde edilenlere kıyasla daha güçlü bir aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. HepG2 hücrelerinin farklı mısır çeşitlerinden elde edilmiş peptit fraksiyonları ile muamele edilmesi sonucunda apoptoz indüksiyon hızının ortalama 4 kat arttığını bildirmişlerdir.

Ayyash ve ark (2018) tarafından yapılan bir çalışma ile buğday, kinoa ve acı bakla *Bifidobacterium spp.*, *B. animalis*, *B. breve* ve *B. longum* suşları kullanılarak 72 saat boyunca 37 °C’de fermentasyona bırakılmıştır. Fermente edilmiş acı baklanın fermente kinoa ve buğdaya kıyasla, kolon kanseri ve meme kanseri hücrelerine karşı sırasıyla 5 ve 3 kat daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür.

González-Montoya ve ark (2018) çimlendirilmiş soya fasulyesinden elde edilen peptitlerin anti-kanserojen özellikte olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada soya fasulyesi protein hidrolizatları pepsin/pankreatin ile enzimatik hidrolize tabi tutulmuş ardından ultrafiltrasyon metodu kullanılarak fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen bütün fraksiyonların, insan kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Rafiq ve ark (2018) bufalo ve inek sütünden yapılmış çedar peynirlerinden elde ettikleri suda çözünür peptit özütlerinin antikanserojen etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Kolon kanseri hücreleri üzerinde (HT -29) antikanser aktivite araştırmak için hücre canlılık testi, hücre döngüsü durdurma ve apoptoz yapmış ve HT-29 hücrelerinde 400 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında maksimum inhibisyon gözlemiştir.

2.4.6. Antidiyabetik Etki

Diyabet, dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilen metabolik bir rahatsızlıktır. Dünyada yaklaşık 336 milyon diyabet hastası bulunmakta ve bu sayı giderek artmaktadır. 2030 yılına gelindiğinde diyabet hastalığından müzdarip insanların sayısının 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Habtamu ve ark., 2018). Tip I ve tip II diyabet olmak üzere iki türü bulunmaktadır. Tip I diyabet beta hücrelerinin tahrip olması sonucu pankreasın insülin salgılayamamasından kaynaklanırken, tip II diyabet düşük insülin üretimi veya vücudun üretilen insülini kullanma yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (Anguizola ve ark., 2013; Lauritano ve Ianora, 2016; Kim, 2014).

Besin alınınının ardından glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glikoz bağımlı insülinotropik polipeptit (GIP) adı verilen inkretin hormonları, glikoz homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (VilSBøll ve Holst, 2004). Bu inkretinler pankreas β hücreleri üzerine etki ederek insülin salınımını uyarır (Silveira ve ark., 2013). Bu hormonların biyolojik aktivitesi, bir serin proteaz olan dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV)'ün etkisiyle önemli ölçüde azalmaktadır (Deacon, 2018; Mulvihill, 2018). DPP-IV'ün bu aktivitesini ortadan kaldırmak ve dolayısıyla kan-şeker seviyesini düzenlemek amacıyla farmakolojik müdahalelerin yanı sıra, gıda proteinlerinin hidrolizinin ardından oluşan DPP-IV inhibe edici aktiviteye sahip peptitler doğal alternatifler olarak tercih edilmektedir (Nongonierma ve Fitzgerald, 2014). Özellikle düşük glisemik indekse (GI) sahip gıdalar olarak bilinen süt ürünleri yemeklerin sindirimini ve emilimini geciktirerek yemekten sonra kan glikozunu baskıladığı bilinmektedir (Sugiyama ve ark., 2003). Süt, yoğurt ve peynir altı suyunun insülin salgılanması üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu (Frid ve ark., 2005; Liljeberg ve Bjorck, 2001; Ostman ve ark., 2001), peynir ve süt ürünlerinin obezite önleyici etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Higurashi ve ark., 2007). Ek olarak, diyabet hastalarında glikoz homeostazının kontrolü için, α -amilaz ve α -glukosidaz gibi karbonhidrat hidrolizinde görev alan enzimlerin aktivitelerini inhibe eden peptitler de kullanılmaktadır (Vilcacundo ve ark., 2017).

Uenishi ve ark (2012) Gouda tipi peynirden elde edilen suda çözünür bir özüt, tip II diyabette glikoz toleransını iyileştirmesi gereken dipeptidil-peptidaz IV (DPP- IV) enzimini inhibe edici aktivite açısından incelenmiştir. Çalışmada suda çözünür özütten sıvı kromatografisi kullanılarak dört adet aktif fraksiyon elde edilmiş ve bu fraksiyonlar sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. X-Pro yapısı ile bu dört peptit $<200 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri göstermiştir. β -kazein kaynaklı bu peptit kalıntılarının 70-77 (b-CN f70-77; LPQNIPPL), olgunlaşma süresi boyunca artan yüksek DPP- IV inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sentezlenen LPQNIPPL, oral olarak (30 mg/100 g sıçan

ağırlığı) sıçanlar üzerinde uygulanmış ve kan şekeri eğrisi altındaki prandiyal bölgenin, LPQNIPPL uygulanan grupta önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

Yu ve ark (2012) albümin hidrolizatlarından, α -amilaz ve α -glikozidaz inhibe edici aktivitelere sahip olan potansiyel antidiyabetik peptitleri tanımlamayı amaçlamışlardır. Çalışmada albümin hidrolizatları saflaştırılıp tanımlanmış, hidrolizatta bulunan peptitlerin sekansları Tandem MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Albüminden sekiz adet yeni peptit elde edilmiştir. Sonuçlar, KLPGF peptidinin, IC_{50} 'si $59.5 \pm 5.7 \mu\text{mol/L}$ olan bir α -glikozidaz inhibe edici aktiviteye ve $120.0 \pm 4.0 \mu\text{mol/L}$ 'lik bir IC_{50} ile α -amilaz inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Zhang ve ark (2016) ipekböceği peptitlerinin potansiyel antidiyabetik aktivitesini, α -glikozidaz inhibe etme yeteneğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan pozitif kontrol ile benzer değerlere sahip Ser-Gln-Ser-Pro-Ala ve Gln-Pro-Gly-Arg olmak üzere iki güçlü peptit tanımlamışlardır.

Fujita ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışma ile soya sütü ile karıştırılmış kuru camu-camu tozu laktik asit bakterilerinin iki suşu olan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus helveticus* kullanılarak fermente edilmiştir. Fermente karışımın, birçok biyoaktif özelliklerle birlikte, α -amilaz ve α -glikozidaz inhibe edebilme yetenekleri değerlendirilmiştir. Fermantasyon sonucunda, oluşan fermente karışımın oldukça yüksek α -amilaz ve α -glikozidaz inhibitör aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma tip II diyabet için kullanılan diyetlere alternatif bir probiyotik içecek tasarlanması açısından önemli görülmektedir.

Neves ve ark (2017) somon jelatinini çeşitli enzim kombinasyonları kullanarak hidroliz etmiş ve elde edilen hidrolizatı DPP-IV enzimini inhibe edebilme yeteneği açısından incelemişlerdir. Hidrolizat, RP-HPLC kullanılarak fraksiyonlanmış ve genel olarak en yüksek *in vitro* biyoaktiviteye sahip fraksiyon (fraksiyon 25), UPLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Bu fraksiyonda dört peptit dizisi (Gly-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Val, Gly-Pro-Val-Ala, Pro-Pro ve Gly-Phe)

ve iki serbest amino asit (Arg ve Tyr) tanımlanmıştır. Bu peptit ve serbest amino asitlerin DPP-IV enzimini inhibe edebilme yeteneği gösterdiği belirlenmiştir.

Nongonierma ve ark (2017) dipeptitil peptidaz IV inhibe etme yeteneğine sahip peptitleri, *in silico* olarak deve sütü proteinleri içerisinde tanımlamışlardır. Deve sütü tripsin ile hidrolize edilmiş ve DPP-IV yarı maksimal inhibitör konsantrasyon değerleri (IC_{50}) 0.52 ± 0.06 ve 1.26 ± 0.13 mg/mL olan 15 hidrolizat üretilmiştir. Bu çalışma ile ilk kez deve sütü peptitlerinin DPP-IV inhibe edici özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

González-Montoya ve ark (2018) yaptıkları bir çalışma ile filizlenmiş soyadan elde edilen peptitlerin, DPP-IV, α -amilaz ve α -glikozidaz enzimlerini inhibe etme potansiyelini araştırmışlardır. Soya filizinden elde edilen protein hidrolizatı pepsin ve pankreatin ile hidroliz edilmiş, ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak peptit fraksiyonları (<5, 5–10 ve >10 kDa) elde edilmiştir. RP-HPLC kullanılarak DPP-IV, α -amilaz ve α -glikozidaz aktivitelerinin inhibisyonu belirlenmiştir. 5-10 ve >10 kDa peptitlerinin DPP-IV'ü inhibe etmede, 5-10 ve <5 kDa peptitlerin ise α -amilaz ve α -glikozidaz inhibe etmede etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Mudgil ve ark (2018) deve sütü proteinlerinden elde edilen peptitleri, DPP-IV, domuz pankreas α -amilazı (PPA) ve domuz pankreas lipazına (PPL) karşı inhibe edici aktivite açısından incelemişlerdir. Farklı enzimler kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda oluşan peptitler, DPP-IV ve PPL'ye karşı çarpıcı bir inhibisyon etkisi gösterirken, PPA inhibisyonunda hafif bir gelişme gözlenmiştir.

2.5. Kars Kaşar Peyniri ve Üretimi

Kaşar (kaşarin) peyniri, ısıtıldığında elastik yapı kazanan, gerildiğinde uzayan pişmiş lor/pasta filata peyniridir ve bu özellikleri sebebiyle genellikle Caciocavallo, Provolone, Mozzarella ve Kaşkaval ile aynı grupta sınıflandırılmaktadır. Üretiminin ardından olgunlaştırılma derecesine göre “taze” ve “olgun” olarak isimlendirilmektedir (Hayaloğlu, 2009). Kaşar peyniri üretimi

için sütün pastörize edilmesi gerekmesine rağmen, en az 120 gün boyunca olgunlaştırılması şartıyla çiğ süttten de kaşar üretilebilmektedir (Anonim, 2019c). Türkiye'nin en çok tercih edilen peynirlerinden birini oluşturmaktadır ve 2014 yılında yapılan araştırmalar sonucunda beyaz peynirin ardından 167.675 ton üretim hacmiyle ikinci sırada yer almaktadır (Anonim, 2019d). Geleneksel kaşar peyniri, çiğ koyun ve inek sütünden veya bunların pastörizasyonu ve başlangıç kültürünü içermeyen kombinasyonlarından yapılmaktadır (Temizkan ve ark., 2014).

Menşenin Balkan ülkeleri olduğu bilinen ve bu ülkelerde farklı isimlerle anılan kaşar peynirinin, ülkemizde Marmara ve Doğu Anadolu bölgelerinde bulunan bazı illerde (Kırklareli, Balıkesir, Bursa, Sakarya, Tekirdağ, Kars) üretimi yapılmaktadır (Koboyeva, 2018). Marmara bölgesindeki illerde üretilen kaşar peynir ile Kars kaşar peyniri benzerlik gösterse de Kars ilinin bitki örtüsü ve iklimi ile o bölgede yetiştirilen ve sütü kullanılan hayvan türleri, bu peynirin üretiminde ve karakteristik özelliklerinde farklılıklara sebep olmaktadır (Demir, 2016).

Kars Kaşar peynirinin üretimi şu şekilde yapılmaktadır; köylerden toplanıp süt işletmelerine getirilen sütler, ilk olarak kaba filtreleme yöntemi ile (tülbent yardımıyla) kirlerinden ayrılır. Filtrelenen sütler, işletmelerde bulunan tanklara alınır ve yaklaşık 30 °C sıcaklıkta 1 saat boyunca pıhtı oluşturmak amacıyla peynir mayası ilavesi yapılır. Pıhtı, kesim için gereken olgunluğa ulaştığında teknelerde parçalara ayrılır. Parçalama işlemi yapılırken ortalama 40 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca ısıtma işlemi tabi tutulur. Isıtma işlemi sonrası pıhtıların dibe çökmesi için 5-10 dakika beklenir. Daha sonra peyniraltı suyu uzaklaştırılır ve baskılama işlemi gerçekleştirilir. İlk olgunlaştırma amacıyla iki kez farklı süre (3-4 saat ve 2-3 saat) ve farklı ağırlıkta (25 kg ve 5 kg) bloklar halinde teleme kesilir ve bekletilir. Ardından teleme iki kez rendelenerek yaklaşık 6-8 saat süreyle bekletilmeye bırakılır. Bu işlemlerin yapılmasının asıl sebebi, telemenin haşlandıktan sonra işlenebilir olmasını sağlamaktır. Teleme, 3 kg'lık parçalar halinde alınarak 75-80°C'de 5-10 dakika kadar haşlanır. Haşlama sırasında teleme bir sopa yardımıyla sürekli karıştırılır. Haşlama işleminden sonra peynir yoğrulur

ve kalıplanır. Kalıba alınan peynirler ön olgunlaştırma için 20 gün beklemeye alınır. Ön olgunlaştırmadan sonra çuvallanarak 4 °C’de 160 gün daha bekletilir (Koboyeva, 2018).

Kaşar peynirinde olgunlaştırıcı maddeler olarak, eklenen peynir mayası (rennet) ve diğer mevcut enzimler görev almaktadır. Peynirin karakteristik lezzetini, görünüşünü ve dokusunu elde etmek için uzun süreli olgunlaşma gerekmektedir. Bununla birlikte uzun olgunlaşma evresi, depolama ve ambalajlama maliyetleri sebebiyle ürün fiyatını önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu yüksek maliyetler de piyasada taklit kaşar peynirlerin görülmesine neden olmaktadır (Balkır ve Metin, 2011).

Peynir ve diğer fermente süt ürünleri çok sayıda biyoaktif protein ve peptit içermektedir (Kitts ve Weiler, 2003). Bazı biyoaktif proteinler ve peptitler sütün kendisinden gelirken çoğunluğu peynir üretim basamaklarında, özellikle olgunlaşma veya proteoliz sırasında oluşmaktadır. (Corrêa ve ark., 2011; Pattom ve Hongsprabhas, 2013; Power ve ark., 2013). Proteoliz, proteinlerin parçalanması işlemi olup olgunlaştırma sırasında peynirde meydana gelen karmaşık biyokimyasal bir olaydır (McSweeney, 2004). Peynirin aromasında ve dokusunda değişikliklere sebep olmakla birlikte çeşitli peptitlerin ve serbest aminoasitlerin oluşumuna da katkı sağlamaktadır (Law ve Goodenough, 1995).

Fermente süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler, çoğunlukla süt, peynir mayası ve bakterilerde bulunan proteazlar ve peptidazlar ile kazeinin hidrolizi sonucu elde edilmektedir. (Sieber ve ark., 2010; Sahingil ve ark., 2014). Kazeinin yanı sıra peynir altı suyu proteinleri ve bunların proteolitik ürünleri de biyoaktivite göstermektedir (Korhonen ve ark., 1998; Lisak-Jakopović ve ark., 2016). Biyoaktif peptit oluşumunun derecesi, sütün tipi, ısıtma işlemi ile olgunlaşma koşulları ve olgunlaşma basamakları gibi bir dizi faktör tarafından etkilenmektedir. Böylece, biyoaktif peptitlerin varlığı, peynirin cinsine ve özelliklerine göre belirlenmektedir. Uzun yıllar boyunca hem süt hem de süt ürünlerinde bulunan protein türlerinin, kazeinlerin ve peynir altı suyu proteinlerinin biyolojik aktiviteye

sahip olduğu bilinmektedir (Gagnaire ve ark., 2011; Sanhingil ve ark., 2014; Gómez-Ruiz ve ark., 2007; Pritchard ve ark., 2010; Sforza ve ark., 2012; Korhonen ve Marnila,2013).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Peynir

Çalışmada Kars iline ait Boğatepe Köyü'nde üretimi yapılan ve Koçulu Peynircilik'ten temin edilen, 14 ay süreyle +4 °C'de olgunlaştırılmış kaşar peyniri (yaklaşık 6 kg) kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar ve enzimler (ADE, pepsin, tripsin, kimotripsin) Sigma (Sigma Chemical Company, MO, USA) ve Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmalarında temin edilmiştir.

3.1.3. Mikroorganizma

Özütlerin antibakteriyel özelliklerinin incelendiği *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* mikroorganizmaları Ç.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.4. Araç ve Gereçler

Spektrofotometrik ölçümlerde “SHIMADZU UV-1700 (Japonya)” marka spektrofotometre, pH ölçümlerinde “ThermoOrion” marka pH metre (ABD), santrifüj işleminde “Eppendorf 5810 R (Almanya)” marka santrifüj cihazı, kurutma işlemlerinde ise “CHRIST ALPHA 2-4 LD (ABD)” marka liyofilizatör, ultrafiltrasyon işleminde “Millipore (ABD)” marka ultrafiltrasyon cihazı kullanılmıştır. Ayrıca “Thermoscientific (ABD)” marka su banyosu, antioksidan ve antibakteriyel aktivite tayinlerinde ise “Thermoscientific MAXQ 500 (ABD)” ve “Mettler UNB 400 (Almanya)” marka inkübatörler kullanılmıştır. ADE inhibisyonu için absorbans ölçümlerinde “Thermoscientific Multiscan GO (ABD)” marka mikropilaka okuyucu kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Absorbans ölçümlerinde kullanılan spektrofotometre



Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan santrifüj cihazı



Şekil 3.3. Özütleme işlemleri sırasında kullanılan inkübatör



Şekil 3.4. Fraksiyonlama işlemi için kullanılan ultrafiltrasyon düzeneği



Şekil 3.5. Dondurarak kurutma işlemleri için kullanılan liyofilizatör



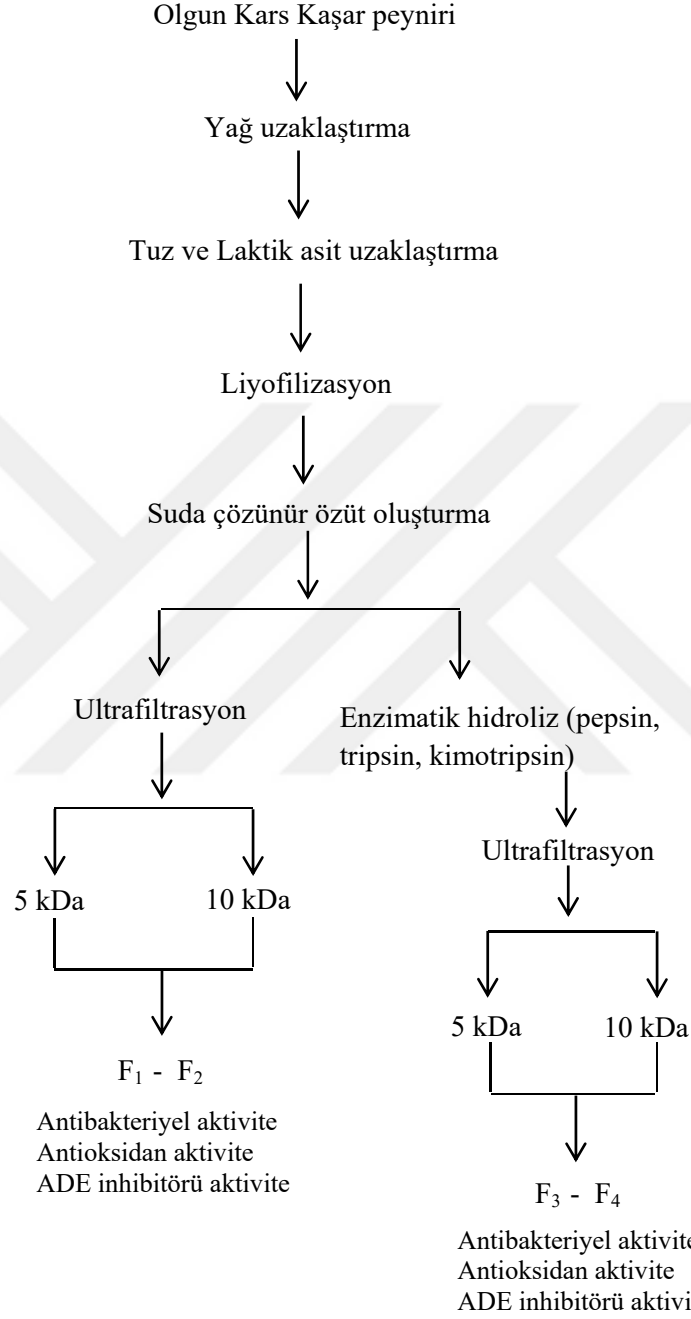
Şekil 3.6. ADE inhibisyonunda kullanılan mikropłaka okuyucu

3.2. Metot**3.2.1. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinde Suda Çözünür Özüt Eldesi****3.2.1.1. Peynirden Suda Çözünür Özütlerin Elde Edilmesi ve Yağların Uzaklaştırılması**

Peynir örneklerinden suda çözünebilir özüt oluşturma işlemleri Rizzello ve ark (2005) tarafından uygulanan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 30 g peynir örneği 90 mL (50 mM, pH 7.0) fosfat tamponu kullanılarak homojenize edilmiş ve 40 °C’ de 1 saat boyunca 150 rpm’de karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 3000 g’de, 4 °C’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından üst kısımdaki yağ tabakası uzaklaştırılmış ve çözünebilir özüt, Whatman no.2 filtre kağıdı yardımı ile filtre edilmiştir. Filtrasyonun ardından özütlerin pH’sı 1 M HCl kullanılarak 4.6’ya ayarlanmıştır. pH’sı ayarlanan özütlerden çöken kazeini uzaklaştırmak için özütler, 10.000 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak suda çözünebilir özütler 0.45 µm gözenek çapındaki filtrelerden geçirilerek -18 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Suda Çözünür Özütlerden Tuz ve Laktik Asitlerin Uzaklaştırılması

Villén ve Gygi (2008)’nın uygulamış olduğu metot kullanılarak suda çözünür özütlerden tuz ve laktik asit uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde Sep-Pak C-18 kartuşu kullanılmış olup, kartuşu şartlandırmak amacıyla ilk olarak 9 mL %50’lik asetonitril geçirilmiştir. Ardından 9 mL % 0.1’lik trifloraasetik asit geçirilerek 5 mL kadar örnek kartuşa yüklenmiştir. Daha sonra örneğin yüklü olduğu kartuştan tekrar 9 mL % 0.1’lik trifloraasetik asit geçirilerek örnekten tuz ve laktik asit uzaklaştırılmıştır. Son olarak %50’lik asetonitril ve % 0.5’lik asetik asit içeren çözeltiden 5 mL kullanılarak örnek elüe edilmiştir. Tuzu ve laktik asiti uzaklaştırılan özütler liyofilize edilmiş ve diğer analizlerde kullanılmak üzere -18 °C’ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.7. Kaşar peynirinden peptit fraksiyonlarının eldesi ve fraksiyonlarla yapılan biyoaktivite çalışmaları.

3.2.2. Enzimatik Hidroliz

Pepe ve ark (2016) ve Parrot ve ark (2003) tarafından kullanılan yöntemlerin kombinasyonu sonucunda 0.5 g liyofilize edilmiş suda çözünür özüt 10 mL saf suda çözündürülmüş ve 1M HCl kullanarak karışımın pH'sı 2 olarak ayarlanmıştır. pH ayarlandıktan sonra 0.01 M HCl içerisinde 0.1 g pepsin/L olacak şekilde pepsin çözeltisi hazırlanıp, 10 mL suda çözünür özüt için 1 mL pepsin olacak şekilde özüt içerisine ilave edilmiştir. Ardından 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun sonucunda 1 M NaOH ile pH 7.5 olarak ayarlanmış ve saf suda 0.5 g tripsin/L ve 0.5 g α -kimotripsin/L olacak şekilde enzim çözeltileri hazırlanarak, 10 mL suda çözünür özüt için 0.20 mL tripsin ve 0.20 mL α -kimotripsin eklenmiştir. 37 °C'de 3 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve inkübasyon bitiminde karışım 85 °C'de 5 dakika bekletilerek hidroliz durdurulmuştur.

3.2.3. Peptitlerin Fraksiyonlarına Ayrılması

Suda çözünebilir özütleme ve enzimatik hidroliz işlemleri sonrası oluşan hidrolizatlar, 5 ve 10 kDa'luk membranlarla ultrafiltrasyon metodu kullanılarak azot gazı altında fraksiyonlarına ayrılmıştır (Cho ve ark, 2004).

3.2.4. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibisyonunun Belirlenmesi

50 μ L 100 mM Tris-HCl, 50 μ L 300 mM NaCl, 50 μ L 10 μ M ZnCl₂, 20 μ L fraksiyon ve 50 μ L N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FA-PGG) karıştırıldıktan sonra 250 μ L 0.025 U/mL enzim ilave edilmiş ve 37 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 340 nm'de köre karşı absorbans ölçümü yapılmıştır. Kör aynı reaksiyon karışımında enzim yerine enzimin çözüldürüldüğü tampon eklenerek hazırlanmıştır. 1 ünite enzim aktivitesi dakikada 1 μ M 3-(2-furylacryloylphenylalanine (FAP) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış ve % inhibisyon değeri;

% ADE İnhibisyonu = $[(\Delta OD A_0 - \Delta OD A_i) / \Delta OD A_0] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Patten ve ark., 2012).

$\Delta OD A_0$ = İnhibitörsüz örneğin optik yoğunluk farkı.

$\Delta OD A_i$ = İnhibitörlü örneğin optik yoğunluk farkı.

IC₅₀ değerleri ise inhibisyon yüzdesine karşı logaritmik konsantrasyon değerleri kullanılarak oluşturulan grafiklerden hesaplanmıştır.

3.2.5. Peptitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılacak Mikroorganizmalar

Antibakteriyel aktivite tayini için *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* türü patojen mikroorganizmalar kullanılmıştır.

3.2.5.2. Tek koloni Eldesi

Bakteriler dilüsyon sıvısında çözündürülerek 10⁻⁴'e kadar seyreltilmiş ve bu seyreltmelerden 0.1 mL alınarak tek koloni düşürmek amacıyla Nutrient Agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır.

3.2.5.3. Disk Difüzyonu Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Tek koloni yöntemi ile elde edilen bakterilerden birer koloni alınarak, 5 mL Nutrient Broth besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından bakteri süspansiyonlarından 0.1 mL alınarak yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra 1 cm çapındaki steril diskler petri kutularına her bir petri için 3 adet olacak şekilde yerleştirilmiş ve disklerle farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonları emdirilmiştir. Daha sonra petriler, 37°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı oldukça yüksek antibiyotik etki gösteren ampisilin, streptomisin ve

kloramfenikol antibiyotikleri pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Fernandez-Agullo ve ark., 2013).

3.2.5.4. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

MİK değerleri, seri seyreltme yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda fraksiyon kullanılarak belirlenmiş ve bu amaçla fraksiyonlar gereken miktarlarda alınarak Nutrient Broth sıvı besiyerine ilave edilmiş ve bu karışımdan 20 mL kadar alınarak üzerine 10^6 hücre/mL oranında bakteri içeren 3 mL kültür sıvısı eklenerek 37°C 'de 48-72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üremenin görülmediği konsantrasyon değeri, MİK değeri olarak alınmıştır (Fernandez-Agullo ve ark., 2013).

3.2.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.6.1. DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Olgunlaştırılmış kaşar peynirinden elde edilen peptit fraksiyonlarının serbest radikal giderme aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) yöntemi kullanılarak belirlenmiş olup her bir fraksiyondan 150 μL alınarak, 2.85 mL kadar metanolle hazırlanan %0.005'lik DPPH çözeltisi üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından tüm fraksiyonlar için, 515 nm dalga boyunda köre karşı absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kör aynı reaksiyon karışımında peptit fraksiyonları yerine saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite sonuçları mM Trolox eşdeğeri/g ekstrakt olarak ifade edilmiş ve standart eğri 20-800 mM Trolox kullanılarak hazırlanmıştır (İsmail ve ark., 2010).

3.2.6.2. FRAP Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

25 mL 300 mM asetat tamponu, 2.5 mL 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ) (40 mM HCl içerisinde hazırlanmış 10 mM TPTZ) ve 2.5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

karıştırılarak 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bu karışımdan 2.85 mL alınarak 150 µL fraksiyon ile karıştırılarak oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında 593 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapılmıştır. Kör aynı reaksiyon karışımında fraksiyon yerine, saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Sonuçlar mMTrolox eşdeğeri/g ekstrakt olarak ifade edilmiş ve standart eğri 20-800 mMTrolox kullanılarak hazırlanmıştır (Zhang ve ark., 2013).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Suda çözünür özütleme işleminin ardından doğrudan ultrafiltre edilerek (5 kDa-10 kDa'luk membran filtre ile) elde edilen F1 (suda çözünür özüt 5 kDa) ve F2 (suda çözünür özüt 10 kDa) fraksiyonları ile enzimatik hidroliz işlemi sonucunda ultrafiltre edilerek (5 kDa-10 kDa'luk membran filtre ile) oluşturulan F3 (enzimatik hidroliz 5 kDa) ve F4 (enzimatik hidroliz 10 kDa) fraksiyonları, antibakteriyel, antioksidan ve ADE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibitörü etki gibi biyoaktif özellikler açısından değerlendirilmiştir.

4.1 Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinden Elde Edilen Peptit Fraksiyonlarının Antibakteriyel Aktivitesi**4.1.1. Disk Difüzyonu ve MİK Yöntemleriyle Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi**

Olgunlaştırılmış Kars Kaşar peynirinden elde edilen peptit fraksiyonlarının *E.coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerine inhibe edici etkileri disk difüzyonu ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Fraksiyonların yanı sıra pozitif kontrol amacıyla ampisilin, streptomisin ve kloramfenikol antibiyotikleri de bu iki bakteri üzerine inhibe edici etki açısından disk difüzyonu yöntemi ile belirlenmiş, disk difüzyonu sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peyniri Peptit Fraksiyonlarının Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

Fraksiyon	<i>E.coli</i> (mm)*	<i>S.aureus</i> (mm)*
F ₁	-	-
F ₂	-	-
F ₃	-	-
F ₄	-	-
Ampisilin	-	-
Streptomisin	-	-
Kloramfenikol	-	-
	23.7±0.58	24.3±2.08
	14.0±1.15	22.3±1.53

*Elde edilen sonuçlar, 3 paralelin ortalamasıdır.

Sonuçlardan görüldüğü gibi olgunlaştırılmış Kars kaşar peynirinden elde edilen dört farklı peptit fraksiyonunda *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı herhangi bir antibakteriyel aktivite gözlenmemiştir. Kontrol olarak kullanılan antibiyotikler arasında Ampisilin iki mikroorganizma için üreme önleyici etki göstermemiştir. Streptomisin *E.coli*'ye karşı 23.7±0.58 mm, *S.aureus*'a karşı 24.3±2.08 mm, Kloramfenikol ise *E.coli*'ye karşı 14.0±1.15 mm, *S.aureus*'a karşı 22.3±1.53 mm zon çapı oluşturmuştur. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) yöntemi sonucunda da peptit fraksiyonlarının çalışılan konsantrasyonda *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir.

Uruguay ve Brezilya'da üretilen koyun peynirleri üzerinde yapılan bir çalışmada peynirlerden elde edilen suda çözünür özütler, farklı biyoaktif özellikler açısından değerlendirilmiştir. Antimikrobiyel aktivite belirlemek için *Bacillus*

cereus ATCC 9634, *S. aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 8739 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları kullanılmış ve analiz sonuçları peynir özütlerinin bu mikroorganizmaların üremesini önleyici etkisinin olmadığını göstermiştir (Meira ve ark., 2012). Araştırmacıların elde ettikleri bu sonuçlar, bu çalışmadaki sonuçlarla paralellik göstermiştir.

Barac ve ark (2019) *in vitro* enzimatik sindirimin geleneksel salamura Sırp beyaz peynirlerinin fonksiyonel potansiyeli üzerine etkisini ele aldıkları çalışmalarında, *in vitro* sindirim sonrasında oluşan peynir özütlerinin çeşitli bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyel aktivitelerini test etmişler ve özütlerde, *E. coli* (ATCC 35210) ve *Bacillus cereus*'un da bulunduğu 8 farklı bakteri türü için herhangi bir antibakteriyel etki gözlemleyememişlerdir. Bir başka çalışmada ise üç farklı Çedar peyniri, antimikrobiyel aktivite açısından incelenmiştir. Mikroorganizma olarak *E. coli*, *S. aureus* ve *B. Cereus* seçilmiş ve peynirlerin peptit fraksiyonlarının *B. Cereus* ve *E. coli* üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu belirlenirken *S.aureus*'a karşı oldukça düşük inhibe edici etki gözlenmiştir (Pritchard ve ark., 2010). Bunun yanında Chatterton ve ark (2006), tripsin kullanılarak β -laktoglobulinin hidrolize edilmesi sonucu oluşan peptitlerin, gram pozitif bakterilerin üremesini önlediğini ve peptitlerin farklı amino asit içeriklerinin bakteriler üzerindeki inhibe edici etkisini arttırdığını ve bu peptitlerin *E.coli* gibi gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışma ile El- Zahar ve ark (2004) tarafından koyun peynir altı suyu proteinlerinin ve peptik hidrolizatlarının antimikrobiyel aktiviteleri, çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, hidrolize olmamış α -laktalbümin ve β -laktoglobulinin aksine, peptik hidrolizatların *E. coli* HB101, *E coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 ve *S. aureus* 9973' suşlarının büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Théolier ve ark (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Kanada'da üretilen Mozzarella, Gouda, İsviçre, olgun ve orta olgunlukta Çedar peynirlerinden elde edilen peptit fraksiyonlarının, çeşitli bakterilere (*Listeria ivanovii*, *Listeria*

monocytogenes, *E. coli* MC4100 ve *E. coli* O157:H7) ve filamentöz mantarlara (*Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* ve *Penicillium*) karşı antimikrobiyel aktiviteleri incelenmiştir. Mozzarella ve Gouda peynirlerinin suda çözünür özütlerinin *L. monocytogenes* üzerinde önemli ölçüde (3.83 ± 0.15 ve 2.93 ± 0.33 log azalması ile) inhibe edici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Tuz ve organik asitlerin uzaklaştırılması işleminin ardından, Mozzarella ve Gouda peynirlerinin suda çözünür özütlerinin, 8.5-17 mg/mL arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile *L. ivanovii* ve *E. coli* MC4100'un azalmasına sebep olduğu bulunmuştur. Fialho ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, Canastra minas peyniri bir aylık süre boyunca *E.coli* bakterisinin üremesini inhibe edebilme yeteneği açısından değerlendirilmiştir. Peynirden elde edilen 6 adet peptidin *E.coli*'ye karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu çalışma sonucunda belirlenmiştir.

Suda çözünür özütleme ve enzimatik hidroliz işlemleri sonucunda oluşan fraksiyonların antibakteriyel aktivitesinin olmaması, peynir olgunlaşma evresinde gerçekleşen yoğun proteoliz, fraksiyonların büyüklüğü, amino asit içeriği ve hidrofobik özelliklerinden kaynaklanabilir. Ayrıca liyofilizasyon sonrası peynir örneğinin kullanılan konsantrasyonu da aktivite görülmemesi nedenlerinden biri olabilir. Enzimatik hidroliz sonrası oluşan fraksiyonlarda aktivite gözlenememesi, hidroliz sırasında sindirim enzimlerinin karşılıklı etkileşimleriyle ilişkilendirilebilir. Lopez-Exposito ve ark (2007) kazeinlerin 30 dakika ve 2 saatten daha uzun süre pepsin ile hidrolizinin antimikrobiyel aktivitelerinde kısmen veya tamamen kayıplara yol açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışma, kaşar peynirinde gerçekleştirilen uzun süreli enzimatik hidrolizin antibakteriyel aktivitedeki kayba sebep olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca kazeinin pepsin, tripsin ve kimotripsin karışımı ile hidrolizi, mikroorganizmalara karşı inaktif peptitlerin oluşumuna sebep olurken, aynı enzimlerle ayrı ayrı sindirimi antimikrobiyel aktiviteli peptitlerin üretilmesini sağlamıştır. Olgunlaşmış Kars Kaşar peynirinde yapılan enzimatik hidrolizde üç enzimi aynı anda kullanmamız aktivite kaybına neden olmuş olabilir.

4.2. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirinden Elde Edilen Peptit Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Olgunlaştırılmış Kars kaşar peynirinin peptit fraksiyonları DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılarak antioksidan aktivite açısından değerlendirilmiştir. Çalışmalarda elde edilen sonuçlar mMol Trolox/g ekstrakt cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Peptit Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları

Fraksiyon	mMol TE/g ekstrakt	
	DPPH*	FRAP*
F ₁	65.56±0.52	50.76±4.05
F ₂	66.55±0.44	159.53±5.36
F ₃	70.13±0.38	304.83±3.54
F ₄	63.02±0.25	798.12±14.18

*Sonuçlar 3 paralelin ortalamasıdır ve değerler Trolox'a eşdeğer olarak

Çizelge 4.2.'deki sonuçlara bakıldığında F₄ fraksiyonun FRAP analizi sonucunda 798.12±14.18 mM Trolox/g ekstrakt değeri ile en yüksek aktiviteye sahip fraksiyon olduğu ve antioksidan aktivitenin sırasıyla, F₄ > F₃ > F₂ > F₁ şeklinde olduğu belirlenirken, DPPH analizi sonucunda en yüksek aktivite F₃ fraksiyonunda 70.13±0.38 mM Trolox/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

Öner ve Sarıdağ (2018) kaşar peynirinin antioksidan aktivitesini inceledikleri çalışmalarında, kaşar peynirini RP-HPLC yardımıyla fraksiyonlarına ayırıp, elde ettikleri F₃, F₄, F₅ ve F₁₄ olarak adlandırılan 5 farklı fraksiyonun antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda fraksiyonların

antioksidan aktiviteleri sırasıyla 920.726 mM Trolox/g ekstrakt, 545.544 mM Trolox/g ekstrakt, 783.864 mM Trolox/g ekstrakt ve 392.12 mM Trolox/g ekstrakt olarak bulunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada Gupta ve ark (2009) olgunlaştırmanın farklı aşamalarında Çedar peynirinin suda çözünür özütünün antioksidan aktivitesini ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), TEAC (trolox-eşdeğer antioksidan kapasite) ve DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemleri kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, peynirin olgunlaşma evrelerinin antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Barac ve ark (2016) tarafından keçi sütünden yapılan ve 50 günlük süre boyunca olgunlaştırılan salamura beyaz peynirin toplam antioksidan kapasitesinin incelendiği bir çalışmada ise, peynirin olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteoliz işleminin suda çözünen ve suda çözünmeyen proteinlerin her ikisinin de antioksidan aktivitelerini artırdığı gözlenmiştir. 50 günlük olgunlaştırmanın sonucunda peynirdeki antioksidan aktivitenin taze peynirinkine kıyasla % 56 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer bir şekilde Parvin ve ark (2016) Bangladeş Gouda ve Dhaka peynirleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, peynirlerdeki antioksidan aktivitenin olgunlaşma ile beraber arttığını dile getirmişlerdir. Diğer yandan Abadia-Garcia ve ark (2013) süzme peynirinden RP-HPLC yardımıyla fraksiyonlanan peptitlerin antioksidan aktivite potansiyelini araştırmışlardır. 8 °C'de 28 gün süre içerisinde depolanan süzme peynirin DPPH ve ABTS deneyleri ile antioksidan etkisi belirlenmiştir. DPPH deneyi sonucunda artan antioksidan aktivite gözlenirken, ABTS yöntemi sonucunda herhangi bir antioksidan etki gözlenememiştir.

FRAP analizi sonucunda, kaşar peynirin enzimlerle hidroliz edilmesi antioksidan aktivitede artışa sebep olmuştur. Ayrıca 10 kDa'luk membran filtreler kullanılarak elde edilen peptit fraksiyonları, 5 kDa'luk fraksiyonlardan daha yüksek antioksidan etki göstermiştir. Bunun yanında DPPH analizi sonuçlarında FRAP sonuçlarında olan korelasyon görülememiştir. Burada F₃ fraksiyonu diğer fraksiyonlardan daha yüksek aktivite göstermiştir.

4.3. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peyniri Peptit Fraksiyonlarının ADE İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi

Anjiyotensin dönüştürücü enzim, güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'nin oluşumunu katalizleyen bir enzimdir ve hipertansiyonla yakından ilişkilendirilir. Hipertansiyon tedavilerinde kaptopril gibi kimyasal olarak sentezlenmiş ilaçlar ve süt proteinlerini de içeren çeşitli ürünlerden doğal olarak üretilen ADE inhibitörü peptitler kullanılmaktadır (Pan ve ark.,2012). ADE enzim aktivitesi ve kaşar peyniri fraksiyonlarının anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) üzerine inhibe edici etkisini araştırmak için N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FA-PGG) substratı kullanılmıştır. Mikroplaka okuyucu yardımıyla 30 dakika boyunca 5 dakika arayla, 340 nm dalga boyunda yapılan absorbans okumaları sonucu belirlenen sonuçlar çizelge 4.3'deki gibi bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Fraksiyonların konsantrasyonlarına göre ADE inhibisyon yüzdeleri

Fraksiyonlar	İNHİBİSYON (%)				
	25 mg/mL	2.5 mg/mL	0.83 mg/mL	0.50 mg/mL	0.25 mg/mL
F ₁	100±0.00	98±5.77	74±5.50	46±8.14	36±8.39
F ₂	100±0.00	66±18.35	59±5.03	36±4.04	27±6.76
F ₃	64±11.53	61±10.96	48±14.29	46±9.71	14±4.00
F ₄	79±2.64	78±13.22	78±9.16	76±0.57	74±11.00

*Sonuçlar optik yoğunluk farkına göre belirlenmiştir ve 3 paralelin ortalamasıdır.

Çizelge 4.3.'de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde yüzde en yüksek ADE inhibisyon aktivitesi F_1 ve F_2 fraksiyonlarında gözlenmiştir. F_1 fraksiyonunun 25 mg/mL konsantrasyonu %100, 2.5 mg/mL konsantrasyonu ise % 98 inhibisyon göstermiştir. Bunun yanında F_2 'nin 25 mg/mL konsantrasyonunun da %100 inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir. F_3 ve F_4 fraksiyonları arasında da F_4 'ün farklı konsantrasyonlardaki inhibisyon yüzdelerinin F_3 'e kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Görüldüğü gibi, suda çözünür hidrolizatların proteolitik enzimlerle hidrolize edilmesi %ADE inhibisyon aktivitesini düşürmüştür.

Çizelge 4.4. Fraksiyonların IC_{50} değerleri

Fraksiyon	IC_{50} (mg/mL)
F_1	7.96 (Ek Şekil 1)
F_2	1.00 (Ek Şekil 2)
F_3	3.22 (Ek Şekil 3)
F_4	141.64(Ek Şekil4)

Çizelge 4.4.'de fraksiyonların IC_{50} değerleri verilmiştir. Bu değer ne kadar düşükse inhibitörün etkinliği o kadar yüksektir. Buna göre en yüksek inhibitör etkinliği $IC_{50}=1.00$ mg/mL değeri ile F_2 fraksiyonu olmuştur. F_2 fraksiyonunu takiben inhibitörün etkinliği, büyükten küçüğe doğru sırasıyla F_3 ($IC_{50}=3.22$ mg/mL), F_1 ($IC_{50}=7.96$ mg/mL) ve F_4 ($IC_{50}= 141.64$ mg/mL) şeklinde gözlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında F_1 fraksiyonu, tüm konsantrasyonlarıyla yüzde olarak daha yüksek inhibe edici etki göstermiş olmasına rağmen F_2 ve F_3 fraksiyonlarına kıyasla daha yüksek IC_{50} değeri vermiştir.

Manchego peynirinin ADE inhibitörü aktivitesinin araştırıldığı çalışmada izole edilen on bir peptit içerisinde iki peptidin (VRYL ve KKYNVPQL) sırasıyla 24.1 ve 77.1 μM IC_{50} değerleri ile önemli ölçüde ADE inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra gastrointestinal sindirimin bu peptitlerin aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve sindirim sonunda iki peptidin inhibitör aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (Ruiz ve ark., 2004). Chiapas krem peyniri üzerine yapılan çalışmada, peynirden elde edilen suda çözünür özütlerin ADE enzimini inhibe etme potansiyeli değerlendirilmiştir. Peynir, 1.75–2.75 mg/mL IC_{50} değerleri arasında ADE inhibitörü etki göstermiştir (Gonzalez-Gonzalez ve ark., 2019).

Parrot ve ark (2003) tarafından yapılan çalışmada, Emmental peynirinden suda çözünür özütler elde edilmiştir. Özütlerin enzimatik sindirim sonrası (IC_{50} = 25 $\pm$ 3 g eşdeğeri peynir/L özüt) ADE aktivitelerinin, sindirim öncesi aktiviteden (IC_{50} = 16.0 $\pm$ 8.1 g eşdeğeri peynir/L özüt) yüksek olduğu ve 10 kDa'luk filtre kullanılarak ultrafiltre edilen özütlerin aktivitelerinde kayıplar olduğu ortaya konmuştur. Sagardia ve ark (2013) olgunlaştırılmış bir peynirin peptit profilini belirlemişlerdir. Süt proteinlerinden ve mikrobiyel enzimlerden 231 adet peptit fragmanı tespit etmiş, tanımlanan peptitlerin, ADE inhibe edici aktivitesini, beş amino asitten daha büyük bir uzunluğa sahip peptitler için daha önce geliştirilmiş kantitatif bir yapı-aktivite ilişkisi modeli kullanarak belirlemişlerdir. 10 peptit sentezleyip *in vitro* ADE inhibe edici aktiviteleri için test ederek, bunlar arasında 6 peptidin *in vitro* olarak yüksek aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Lu ve ark (2016) ticari olarak üretilen farklı olgunluktaki Wisconsin Cheddar peynirleri ile yapılan bir çalışmada ADE inhibitör aktivitesine sahip peptitlerin varlığını araştırmışlardır. Yüksek ADE inhibitör aktivitesi gösteren 6 adet peptidi (Ile-Pro-Pro (IPP), Val-Pro-Pro (VPP), Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe (EKDERF), Val-Arg-Tyr-Leu (VRYL), Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (YFPGPPIP) ve Phe-Phe-Val-Ala-Pro (FFVAP)), fraksiyonlara ($\leq 3,000$ Da) ayrılan suda çözünür özütlerde belirlemişlerdir. 6 ADE inhibitörü peptidin konsantrasyonlarının, belirli bir olgunlaşma süresine kadar artış gösterdiğini ve

olgun Cheddar peynirinin zengin bir ADE inhibitörü peptit kaynağı olduğunu tespit etmişlerdir.

Kaşar peynirinden elde edilen 4 adet peptit fraksiyonu arasından yüzdece en yüksek ADE inhibisyon aktivitesi F1 ve F2 fraksiyonlarında gözlenmiştir. Enzimatik hidrolizin ardından oluşan fraksiyonların (F3 ve F4) aktivitelerinin daha düşük olmasının sebebi, hidroliz sırasında ADE inhibitörü aktiviteye sahip peptitlerdeki kayıplardan kaynaklanabilir. Bununla birlikte, in vitro da gözlenen yüksek ADE inhibitör etkisinin, in vivo hipotansif etki için bir garanti olmadığı belirtilmelidir. Ayrıca IC50 sonuçları ile, ADE enziminin %50'sini inhibe edebilmek için F1 fraksiyonundan 7.96 mg/mL, F2 fraksiyonundan 1.00 mg/mL, F3 fraksiyonundan 3.22 mg/mL, F4 fraksiyonundan ise 141.64 mg/mL gerektiği belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, olgunlaştırılmış Kars Kaşar peyniri, ilk olarak suda çözünür özütleme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen özütlerin bir kısmı doğrudan ultrafiltrasyon yöntemiyle fraksiyonlarına ayrılırken (F_1 , F_2), bir diğer kısmı enzimatik hidroliz işlemlerinin ardından fraksiyonlarına (F_3 , F_4) ayrılmıştır. Böylece fraksiyonlama işlemlerinin sonucunda dört farklı peptit fraksiyonu elde edilmiş (F_1 , F_2 , F_3 ve F_4) ve bu fraksiyonların, disk difüzyonu ile minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) metotları kullanılarak *E.coli* ve *S. aureus* bakterilerinin üremelerini önleyici etkileri, serbest radikal giderme gücü (DPPH) ve indirgeme gücü kapasitesi (FRAP) yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri, yüksek tansiyonda önemli yere sahip olan ADE (anjyotensin dönüştürücü enzim) enzimini inhibe etme yetenekleri araştırılmıştır.

Çalışma ile elde edilen bulgulara bakıldığında;

- ✓ Fraksiyonlarda disk difüzyonu ve MİK analizleri sonucunda *E.coli* ve *S.aureus* üzerine antibakteriyel aktivite gözlenmemiştir.
- ✓ Antioksidan analiz sonuçları, FRAP analizine göre F_4 fraksiyonunda 798.12 ± 14.18 mM Trolox/g ekstrakt değeri ile en yüksek bulunurken, en düşük aktivite F_1 fraksiyonda 50.76 ± 4.05 mM Trolox/g ekstrakt değeriyle belirlenmiştir. DPPH yöntemine göre en yüksek aktivite F_3 fraksiyonunda 70.13 ± 0.38 mM Trolox/g ekstrakt, en düşük aktivite 63.02 ± 0.25 mM Trolox/g ekstrakt ile F_4 'de bulunmuştur.
- ✓ ADE inhibitörü aktivite sonuçlarına bakıldığında dört fraksiyon arasından en yüksek inhibisyon yüzdesi (%100 inhibisyon ile) enzimatik hidroliz fraksiyonlarına (F_3, F_4) kıyasla suda çözünür özüt fraksiyonlarında (F_1 , F_2) belirlenmiştir. F_3 fraksiyonunun üç farklı konsantrasyonunda ise en düşük inhibisyon yüzdesi gözlenmiştir. Uygulanan enzimatik hidroliz, fraksiyonların ADE inhibisyon yüzdesini azaltmıştır.

- ✓ Fraksiyonların IC_{50} değerleri, 1.00-141.64 mg/mL arasında belirlenmiştir. Bu değerlere göre en düşük inhibitör etkinliği F_4 ($IC_{50}= 141.64$ mg/mL) fraksiyonunda görülürken, en yüksek inhibitör etkinliği F_2 ($IC_{50}=1.00$ mg/mL) fraksiyonunda belirlenmiştir. F_1 fraksiyonu iki konsantrasyonu ile ADE enzimine karşı yüzdece daha yüksek inhibe edici etki gösterse de, IC_{50} değeri F_2 ve F_3 'e kıyasla daha yüksek bulunmuştur.



KAYNAKLAR

- Abadia-Garcia, L., Cardador, A., del Campo, S.T.M., Arvízu, S.M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., Amaya-Llano, S.L., 2013. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33, 191–197.
- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., Hamad, E., 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International dairy journal*, 66, 91-98.
- Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Peres, C., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75.
- Aina, O.H., Sroka, T.C., Chen, M.L., Lam, K.S., 2002. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*, 66(3), 184–199.
- Alaiz, M., Beppu, M., Ohishi, K., Kikugawa, K., 1994. Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation to macrophage scavenger receptor binding. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 51–7.
- Anguizola, J., Matsuda, R., Barnaby, O.S., Hoy, K.S., Wa, C., DeBolt, E., Koke, M., Hage, D.S., 2013. Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*, 425, 64–76.
- Anonim, 2019a (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/)

- Anonim, 2019b Worldwide Cancer Statistics. Available online: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer> (accessed on 16 January 2018). Cancer. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (accessed on 16 January 2018)
- Anonim, 2019c (Türk Gıda Kodeksi, 2015). Türk gıda kodeksi peynir tebliği, Vol. 2015/6, Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Ankara.
- Anonim, 2019d (Türk İstatistik Enstitüsü, 2016). Production and sales of industrial products, 2005-2015, 10.51.40.50.01 kaşar peyniri. Turkish Statistical Institute, Ankara.
- Ariyoshi, Y., 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from proteins. Trends of Food Science Technology, 4, 139-144.
- Arrutia, F., Rubio, R., Riera, F.A., 2016. Production and membrane fractionation of bioactive peptides from a whey protein concentrate. Journal of Food Engineering, 184, 1–9.
- Ashar, M.N., Chand, R., 2004. Fermented milk containing ACEinhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. Milchwissenschaft, 59, 363–366.
- Ayyash, M., Johnson, S.K., Liu, S.Q., Al-Mheiri, A., Abushelaibi, A., 2018. Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by Bifidobacterium species: In-vitro investigations. LWT- Food Science and Technology, 95, 295-302.
- Barac, M., Pesic, M., Zilic, S., Smiljanic, M., Stanojevic, S., Vasic, M., Despotovic, S., Vucic, T., Kostic, A., 2016. Protein profiles and total antioxidant capacity of water-soluble and waterinsoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. International Journal of Food Science & Technology, 51, 1140–1149.

- Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Kostic, A., Ignjatovic, I.S., Milincic, D., 2019. The Effect of In Vitro Digestion on Antioxidant, ACE-Inhibitory and Antimicrobial Potentials of Traditional Serbian White-Brined Cheeses. *Foods*, 8(3), 94.
- Balkır, P., Metin, M., 2011. Physicochemical and textural properties of imitation fresh kashar cheeses prepared from casein, caseinates and soy protein. *Gıda*, 36(1), 17-24.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, 1, 141–50.
- Barra, D., Simmaco, M., 1995. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*, 13, 205–10.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H. F., 2015. Bioactive peptides from egg: a review. *Nutrition and Food Science*, 45, 190–212.
- Bhuyan, B.J., Muges, G., 2012. Antioxidant activity of peptide-based angiotensin converting enzyme inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(11), 2237-47.
- Bode, W., 2006. Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36 (2), 122-130.
- Borghouts, C., Kunz, C., Groner, B., 2005. Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *Journal of Peptide Science*, 11(11), 713–726.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D., 2008. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides val-pro-pro and ile-pro-pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, 91 (1), 29-38.
- Calderón de la Barca, A.M., Ruiz-Salazar, R.A., Jara-Marini, M.E., 2000. Enzymatic hydrolysis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science*, 65, 246–53.

- Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B., 1999. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 291–296.
- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, A.M., 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from α -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*, 73(04), 583-90.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A., 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin: Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229–1240.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., 1995. Structural analysis of antioxidant peptides from soybean β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574–578.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K., 1996. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2619–23.
- Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., Cushman, D.W., 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-7.
- Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T., Ding, G.F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, 301-313.
- Cho, M., Unklesbay, N., Hsieh, F., Clarke, A., 2004. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5895–5901.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217–246.

- Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Coelho, J., Meira, S.M.M., Lopes, F.C., Segalin, J., Risso, P.H., Brandelli, A., 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2247-2254.
- Davie, E.W., Fujikawa, K., Kisiel, W., 1991. The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30 (43), 10363-10370.
- De Simone, C., Ferranti, P., Picariello, G., Scognamiglio, I., Dicitore, A., Addeo, F., Chianese, L., Stiuso, P., 2010. Peptides from water buffalo cheese whey induced senescence cell death via ceramide secretion in human colon adenocarcinoma cell line. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(2), 229–238.
- De Simone, C., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Chianese, L., Addeo, F., Ferranti, P., 2009. Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey. *Journal of Peptide Science*, 15 (3), 251-258.
- Deacon, C.F., 2018. Peptide degradation and the role of DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Peptides*, 100, 150–157.
- Demir, M., 2016. Coğrafi İşaret Örneği Olarak Kars Kaşar Peynirinin Üretimi ve Dağılımı. *Kafkas Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 1, 61-81.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., Hayes, M., 2011. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Dia, V.P., Bringe, N.A., de Mejia, E.G., 2014. Peptides in pepsin–pancreatin hydrolysates from commercially available soy products that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages. *Food Chemistry*, 152 (1), 423–431.

- Dziuba, B., Dziuba, M., 2014. Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13, 5–25.
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Metro, F., Haertle, T., Chobert, J. M., 2004. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft*, 59(11), 653-656.
- Enback, J., Laakkonen, P., 2007. Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction. *Biochemical Society Transactions*, 35(4), 780–783.
- Erdoş, E.G., Skidgel, R.A., 1987. Cleavage of peptide bonds by Angiotensin I Converting enzyme. *Agents and Actions Supplements*, 22, 289-296.
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P.D., Aristoy, M. C., Toldrá, F., 2013. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1282-1288.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 52,1–8.
- Fearon, D., Locksley, R., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272, 50–4.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127, 2893–2917.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France.

- Fernandez–Agullo, A., Pereira, E., Freire, M.S., Valentaoc, P., Andrader, P.B., 2013. Influence of solvent on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husk Extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126.
- Fialho, T.L., Carrijo, L.C., Júnior, M.J.M., Baracat-Pereira, M.C., Piccoli, R.H., de Abreu, L.R., 2018. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, 107, 406-413.
- Fitzgerald, R.J., Meisel, H., 2003. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (eds), *Advanced Dairy Chemistry Proteins*. Springer US, Boston, pp. 675–698.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980-988.
- Fitzgerald, R.J., Murray, B.A., 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.
- Fitzgerald, R.J., Murray, B.A., 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.
- Fontenele, M.A., Bastos, M., do, S.R., dos Santos, K.M.O., Bemquerer, M.P., do Egito, A.S., 2017. Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chemistry*, 219, 382–390.
- Frid, A.H., Nilsson, M., Holst, J.J., Björck, I.M., 2005. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 69-75.
- Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson, D., Nyborg, C.B., 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin-converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 27–34.

- Fujita, A., Sarkar, D., Genovese, M.I., Shetty, K., 2017. Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation. *Process Biochemistry*, 59, 133-140.
- Furie, B., Furie, B.C., 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53 (4), 505-518.
- Gagnaire, V., Carpino, S., Pediliggieri, C., Jardin, J., Lortal, S., Licitra, G., 2011. Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of Ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12443-12452.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- García, M.C., Puchalska, P., Esteve, C., Marina, M.L., 2013. Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349.
- Gardner, M.L., 1988. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual review of nutrition*, 8(1), 329-350.
- Gibbs, B.F., Zoygman, A., Masse, R., Mulligan, C., 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37,123.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G., 2004. Angiotensin I converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172–188.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223-239.

- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I., 2007. Identification of novel angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, 28, 4202-4208.
- Gonzalez-Gonzalez, C.R., Machado, J., Correia, S., McCartney, A.L., Elmore, J.S., Jauregi, P., 2019. Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *LWT*, 111, 449-456.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R., Martínez-Villaluenga, C., 2018. Bioactive Peptides from Germinated Soybean with Anti-Diabetic Potential by Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-IV, α -Amylase, and α -Glucosidase Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2883.
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J.M., Mora-Escobedo, R., Martínez-Villaluenga, C., 2018. Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242, 75-82.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2009. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 339–347.
- Habtam, A., Gasmalla, M.A.A., Yang, R.J., Zhang, W., 2018. Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties. *Journal of Food Science*, 83, 6–16.
- Haileselassie, S.S., Lee, B.H., Gibbs, B.F., 1999. Purification and Identification of Potentially Bioactive Peptides from Enzyme-Modified Cheese. *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1612–1617.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *The Lancet*, 344, 721–4.

- Hancock, R.E.W., 2001. Cationic peptites: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Diseases*, 1(3), 156-64.
- Hancock, R.E.W., Lehrer, R., 1998. Cationic peptites: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82-8.
- Hardy, G., 2000. Nutraceutical and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 16, 688-698.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.
- Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K.A., Kumagai, H., Feng, Y., Takahashi, K., 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2167–70.
- Hayaloglu, A.A., 2009. Volatile composition and proteolysis in traditionally produced mature Kashar cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(7), 1388-1394.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-derived antimicrobial peptites generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2260-2264.
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L., 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I., Amigo, L., 2006. Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 31-37.
- Higurashi, S., Kunieda, Y., Matsuyama, H., Kawakami, H., 2007. Effect of cheese consumption on the accumulation of abdominal adipose and decrease in serum adiponectin levels in rats fed a calorie dense diet. *International Dairy Journal*, 17, 1224-1231.
- Hultmark, D., 2003. *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, 15, 12–9.
- Hwang, J.Y., Shyu, Y.S., Wang, Y.T., Hsu, C.K., 2010. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. *Food Science and Technology*, 43, 285–90.
- Ibe, S., Yoshida, K., Kumada, K., Tsurushiin, S., Furusho, T., Ootobe, K., 2009. Antihypertensive effects of natto, a traditional Japanese fermented food, in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Technology Research*, 15, 199.
- Ibrahim, H.R., Isono, H., Miyata, T., 2018. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 273-280.
- İsmail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., İsmail, M., 2010. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Cantaloupe (*Cucumis melo*) Methanolic Extracts, *Food Chemistry*, 119, 643.
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D.L., 1996. Lipid oxidation in biological and food systems. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., editors. *Food Antioxidants*. New York: Dekker, 5–63.

- Jahanbani, R., Ghaffari, S.M., Salami, M., Vahdati, K., Sepehri, H., Sarvestani, N.N., Sheibani, N., Moosavi-Movahedi, A.A., 2016. Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 402-409.
- Jang, A, Lee, M., 2005. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69, 653–661.
- Jang, A., Jo, C., Kang, K.S., Lee, M., 2008. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107, 327-336.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K., 2007. Purification and characterization of n antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42,840–6.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. “Global cancer statistics” *CA Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. “Global cancer facts & figures,” 2nd edition, American Cancer Society.
- Jin, D.X., Liu, X.L., Zheng, X.Q., Wang, X.J., He, J.F., 2016. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 204, 427-436.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J., Ergul, A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4,5.
- Johnston, C.I., 1992. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of Hypertension*, 10, 13- 26.
- Jolles, P., 1975. Structural aspects of the milk clotting process Comparative features with the blood clotting process. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 7, 73–85.

- Kakde, D., Jain, D., Shrivastava, V., Kakde, R., Patil, A.T., 2011. Cancer therapeutics—opportunities, challenges and advances in drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(9), 1–10.
- Kampa, M., Loukas, S., Hatzoglou, A., Martin, P., Martin, P.M., Castanas, E., 1996. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α s1 casein (α s1-casomorphin, and α s1-casomorphin amide). *Biochemical Journal*, 319(3), 903–908.
- Kamran, F., 2017. Enzymatic Hydrolysis of Lupin (*Lupinus angustifolius*) Protein: Isolation and Characterization of Bioactive Peptides. PhD Thesis submitted to Western Sydney University, Australia.
- Kamran, F., Salampessy, J., Reddy, N., 2016. Application of NMR Spectroscopy for Structural Characterization of Bioactive Peptides Derived from Food Protein. In: & A-u-R, Choudhary Mi, editors. *Applications of NMR Spectroscopy*. 5: Bentham Science Publishers Ltd, Sharjah UAE. 3-76.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J.I., Matsuoka, T.A., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., Hori, M., 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes possible protection of pancreatic b-Cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48, 2398–406.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Marshall, M., 2010. Food Proteins and Peptides as Bioactive Agents. In: Hettiarachchy N, editor. *Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health*: CRC. 1-28.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Marshall, M., 2012. Food Proteins and Peptides as Bioactive Agents. *Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health*, Eds: N. S. Hettiarachchy. CRC Press, Taylor And Francis Group, Boca Raton, s.1-27.
- Khiari, Z., Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2013. Structure elucidation of ACE-inhibitory and antithrombotic peptides isolated from mackerel skin gelatine hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1663–1671.

- Kınık, Ö., Akbulut, N., 1994. Sütün Yapısındaki Biyoaktif Peptitler. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Dergisi, 31 (2-3), 269-275.
- Kınık, Ö., Gürsoy, O., 2002. Süt Proteinleri Kaynaklı Biyoaktif Peptitler. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8(2), 195-203.
- Kilara, A., Panyam, D., 2003. Peptides from milk proteins and their properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43, 607–633
- Kim, C., 2014. Maternal outcomes and follow-up after gestational diabetes mellitus. Diabetic Medicine 31(3), 292–301.
- Kim, S.E., Kim, H.H., Kim, J.Y., Kang, Y.I., Woo, H.J., Lee, H.J., 2000. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. BioFactors, 12, 151-5.
- Kitts, D.D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design, 9, 1309-1323.
- Kleekayai, T., Harnedy, P.A., O’Keeffe, M.B., Poyarkov, A.A., CunhaNeves, A., Suntornsuk, W., FitzGerald, R. J., 2015. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. Food chemistry, 176, 441-447.
- Koboyeva, F., 2018. Dağ ve Ova İşletmelerinde Farklı Mevsimlerde Üretilen Taze Kars Kaşarlarının Bazı Kalite Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.21-23.
- Kodera, T., Nio, N., 2006. Identification of an Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptides from Protein Hydrolysates by a Soybean Protease and the Antihypertensive Effects of Hydrolysates in 4 Spontaneously Hypertensive Model Rats. Journal of Food Science, 71(3).
- Korhonen, H., Marnila, P., 2013. Milk bioactive proteins and peptides, in Milk and dairy products in human nutrition and health, Park, Y. and Haienlain, G. (eds), John Willey and Sons, UK, s. 148-188.

- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., 2000. Milk Protein-Derived Bioactive Peptides- Novel Opportunities For Health Promotion. *Bulletin of IDF* 363, 17-26.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamäki, P., Tupasela, T., 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 307–319.
- Kuba, M., Tana, C., Tawata, S., Yasuda, M., 2005. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochemistry*, 40(6), 2191-6.
- Kumar, K.N., Tilakaratne, N., Johnson, P.S., Alien, A.E., Michaelis, E.K., 1991. Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex. *Nature*, 354(6348),70.
- Kwak, N.S., Jukes, D.J., 2001. Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control*, 13, 99-107.
- Lafarga, T., Hayes, M., 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98,227–239.
- Lai, R., Liu, H., Hui Lee, W., Zhang, Y., 2002. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(4), 796-9.
- Lauritano, C., Ianora, A., 2016. Marine organisms with anti-diabetes properties. *Marine Drugs*, 14(12), 220.

- Law, B.A., Goodenough, P.W., 1995. Enzymes in Milk and Cheese Production. Tucker, G.A., & Woods, L.F.J., (Eds), *Enzymes in Food Processing*. (p.114-143). Chapman & Hall, London, s. 319.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21–33.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Current Opinion in Immunology*, 11, 23–7.
- Li, F.J., Yin, L.J., Cheng, Y.Q., Yamaki, K., Fan, J.F., Li, L.T., 2009. Comparison of angiotensin I-converting enzyme inhibitor activities of pre-fermented Douchi (a Chinese traditional fermented soybean food) started with various cultures. *International Journal of Food Engineering*, 5,10.
- Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24, 469-486.
- Li, J.T., Zhang, J.L., He, H., Ma, Z.L., Nie, Z.K., Wang, Z.Z., Xu, X.G., 2013. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 297–305.
- Li, S., Hao, L., Bao, W., Zhang, P., Su, D., Cheng, Y., Nie, L., Wang, G., Hou, F., Yang, Y., 2016. A novel short anionic antibacterial peptide isolated from the skin of *Xenopus laevis* with broad antibacterial activity and inhibitory activity against breast cancer cell. *Archives of Microbiology*, 198(5), 473–482.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S., Segato, S., 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevo cheese. *International dairy journal*, 20(1), 11-17.

- Liljeberg, E.H., Bjorck, I., 2001. Milk as a supplement to mixed meals may elevate postprandial insulinaemia. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55, 994-999.
- Lin, K., Zhang, L., Han, X., Zhaoxu Meng, Z., Zhang, J., Yifan Wu, Y., Chen, D., 2018. Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling Coupled with Molecular Docking Analysis in Screening of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Qula Casein Hydrolysates Obtained by Two-Enzyme Combination Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 3221–3228.
- Lisak-Jakopović, K., Barukčić, I., Božanić, R., 2016. Physiological significance, structure and isolation of α -lactalbumin. *Mljekarstvo*, 66(1), 3-11.
- Liu, C., Ren, D., Li, J., Fang, L., Wang, J., Liu, J., Min, W., 2018. Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fisch) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 42, 203-215.
- Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W., 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467–74.
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G.H., Zhang, W.G., 2016. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 5: 32.
- Lopez-Exposito, I., Quiros, A., Amigo, L., Recio, I., 2007. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait*, 87(4–5), 241–249.
- Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., Lucey, J.A., 2016. Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 41-52.
- Luchtman-Jones, L., Broze, G.J. 2009. The current status of coagulation. *Annals of Medicine*, 27, 47-52.

- Luna-Vital, D.A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., 2015. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76, 39–50.
- Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, S., 2004. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5533–5538.
- Majumder, K., Wu, J., 2010. A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. *Food Research International*, 43(5), 1371-8.
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F., Hrelia, S., 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 21120–21135.
- Mark-Herbert, C., 2004. Innovation of a new product category - functional foods. *Technovation*, 24, 713-719.
- Martínez-Villaluenga, C., Dia, V. P., Berhow, M., Bringe, N. A., de Mejia, E. G., 2009. Protein hydrolysates from α -Conglycinin enriched soybean genotypes inhibit lipid accumulation and inflammation in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (8), 1007–1018.
- Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., Perdigon, G., 2003. Biologically active peptides released in fermented milk: Role and functions. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series*. Florida, USA: CRC Press. s. 177–201.

- Matchar, D.B., McCrory, D.C., Orlando, L.A., Patel, M. R., Patel, U.D., Patwardhan, M. B., Powers, B., Samsa, G.P., Gray, R.N., 2008. Systematic review: comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 148, 16-29.
- McDonagh, D., FitzGerald, R.J., 1998. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *International Dairy Journal*, 8(1), 39-45.
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In P.F., Fox, P.L.H., Mc Sweeney, T.M., Cogan, T.P., Gunee (Eds.). *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. London, UK: Academic Press. 1, s. 347-360
- Medzhitov, R., Janeway, C.J., 2000. Advances in immunology: innate immunity. *The New England Journal of Medicine*, 343, 338–44.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J., 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *Food Science and Technology*, 41, 1973–7.
- Meira, S.M.M., Daroit, D.J., Helfer, V.E., Corrêa, A.P.F., Segalin, J., Carro, S., Brandelli, A., 2012. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.
- Meisel, H., 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Peptide Science*, 43(2), 119-128.
- Meisel, H., 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21, 55–61.
- Meisel, H., FitzGerald, R.J., 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1289–1295.

- Meisel, H., Goepfert, A., Gunther, S., 1997. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, 52, 307–311.
- Meisel, H., Schlimme, E., 1990. Trends in Food Science & Technology Journal, 1, 41.
- Meisel, H., Walsh, D., Murray, B., FitzGerald, R., 2006. Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Diseases. ACE inhibitory peptides In: Mine Y, Shahidi F, editors *Nutraceutical Science and Technology*, 269-315.
- Menrad, K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181-188.
- Meyer, A., 1998. The 1998 top 100 R&D survey. *Food Process*, 58, 32–40.
- Milner, J.A., 1998. Do “functional foods” offer opportunities to optimize nutrition and health? *Food Technology*, 52, 24.
- Mine, Y., Li-Chan, E., Jiang, B. (Eds). 2010. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Wiley-Blackwell. 265-273.
- Miralles, B., Amigo, L. ve Recio, I., 2018. Critical Review and Perspectives on Food-Derived Antihypertensive Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 9384–9390.
- Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171–182.
- Mora, L., Reig, M., Toldra, F., 2014. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, 344–349.
- Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2005. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7600–8
- Mudgil, P., Kamal, H., Yuen, G. C., Maqsood, S., 2018. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 259, 46-54.

- Mulvihill, E.E., 2018. Dipeptidyl peptidase inhibitor therapy in type 2 diabetes: Control of the incretin axis and regulation of postprandial glucose and lipid metabolism. *Peptides*, 100, 158–164.
- Murray, B.A., FitzGerald, R.J., 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773–791.
- Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K.R.I., Chikata, H., Kinoshita, E., Uchida, R., 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5858.
- Nasri, R., Nasri, M., 2013. Marine-derived bioactive peptides as new anticoagulant agents: A review. *Current Protein and Peptide Science*, 14(3), 199-204.
- Natesh, R., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D., Acharya, K.R., 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551-4.
- Neves, A.C., Harnedy, P.A., O'Keeffe, M.B., Alashi, M.A., Aluko, R.E., FitzGerald, R.J., 2017. Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities. *Food Research International*, 100, 112-120.
- Ngo, D.H., Vo, T.S., Ryu, B., Kim, S.K., 2016. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 51(10), 1622-1628.
- Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J., 2014. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 165, 489–498.

- Nongonierma, A.B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., FitzGerald, R.J., 2017. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of camel milk protein hydrolysates generated with trypsin. *Journal of Functional Foods*, 34, 49–58.
- Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y., Yanadiga, F., 1995. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 1147.
- Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluvec, J., Weaver, E. R., Kocy, O., 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*, isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*, 10, 4033-4039.
- Ong, L., Shah, N.P., 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (9), 1555-1566.
- Ortiz-Martinez, M., Gonzalez de Mejia, E., García-Lara, S., Aguilar, O., LopezCastillo, L. M., Otero-Pappatheodorou, J.T., 2017. Antiproliferative effect of peptide fractions isolated from a quality protein maize, a white hybrid maize, and their derived peptides on hepatocarcinoma human HepG2 Cells. *Journal of Functional Foods*, 34, 36–48.
- Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., Otte, J., 2016. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 480-486.
- Ostman E.L.M., Liljeberg Elmstahl, H.G.M., Bjorck, I.M.E., 2001. Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 96-100.

- Öner, Z., Sarıdağ, A.M., 2018. Identification of bioactive peptides in kashar cheese and its antioxidant activities. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 2(2), 44-49.
- Pan, D., Cao, J., Guo, H., Zhao, B., 2012. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 130(1), 121-126.
- Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F., Kim, S.K., 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651–656.
- Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C., Martial-Gros, A., 2003. In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung/Food*, 47(2), 87–94.
- Parvin, S., Rahman, M.M., Shimazaki, K.I., Kato, I., 2010. A comparative study of the changes in different parameters and in the antioxidant activity of Dhaka and Gouda-type cheeses during ripening. *Milchwissenschaft*, 65, 161–165.
- Patten, G.S., Abeywardena, M.Y., Hea, R.J., 2012. Processed Dietary Plants Demonstrate Broad Capacity for Angiotensin Converting Enzyme and Angiotensin II Receptor Inhibition in vitro. *Journal of Functional Foods*, 4, 851-863.
- Pattom, S., Hongsprabhas, P., 2013. Effect of coagulants on antioxidant capacity of milk protein curds and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 203-211.
- Pei, J., Jiang, H., Li, X., Jin, W., Tao, Y., 2017. Antimicrobial peptides sourced from post-butter processing waste yak milk protein hydrolysates. *AMB Express*, 7(1), 217.

- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M.C., Adesso, S., Ostacolo, C., Marzocco, S., Novellino, E., Campiglia, P., 2016. Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 26, 494–505.
- Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R.J., O'Brien, N.M., 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H., 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3-10.
- Pihlanto-Leppala, A., 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347–356.
- Pihlanto-Leppala, A., Rokka, T., Korhonen, H., 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325–331.
- Power, O., Jakeman, P., Fitzgerald, R.J., 2013. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44, 797-820.
- Pritchard, S.R., Phillips, M., Kailasapathy, K., 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545-1548.
- Qian, Z.Y., Jolles, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F., Fiat, A.M., 1995. Sheep kappa-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1244, 411–7.

- Qiao, M., Tu, M., Wang, Z., Mao, F., Chen, H., Qin, L., Du, M., 2018. Identification and antithrombotic activity of peptites from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein. International Journal of Molecular Sciences, 19(1), 138.
- Qureshi, T.M., Vegarud, G.E., Abrahamsen, R.K., Skeie, S., 2013. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of the Norwegian autochthonous cheeses Gamalost and Norvegia after in vitro human gastrointestinal digestion. Journal of Dairy Science, 96(2), 838–853.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Shahid, M., Xiao, H., 2016. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory and antithrombotic activities of soluble peptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses. International Journal of Dairy Technology, 70(3), 380–388.
- Rafiq, S., Huma, N., Rakariyatham, K., Hussain, I., Gulzar, N., Hayat, I., 2018. Anti-inflammatory and anticancer activities of water-soluble peptide extracts of buffalo and cow milk Cheddar cheeses. International Journal of Dairy Technology, 71(2), 432-438.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., Kim, S.K., 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International, 38,175–82.
- Revilla, E., Maria, C.S., Miramontes, E., Bautista, J., García-Martínez, A., Cremades, O., Cert, R., Parrado, J., 2009. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. Food Research International, 42, 387–93.
- Rho, S.J., Lee, J.S., Chung, Y., Kim, Y.W., Lee, H.G., 2009. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. Process Biochemistry, 44, 490.

- Rizzello, C.G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D., Zambonin, P.G., 2005. Antibacterial activities of peptides from the water soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348–2360.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M., 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147–154.
- Ruiz, J.Á.G., Ramos, M., Recio, I., 2004. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14(12), 1075–1080.
- Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G F., Stanton, C., 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3, 765–791.
- Ryder, K., Bekhit, A.E.D., McConnell, M., Carne, A., 2016. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208, 42–50.
- Ryhanen, E.L., Pihlanto-Leppala, A., Pakkala, E., 2001. A new type of ripened; low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11, 441–447.
- Sabbione, A.C., Nardo, A.E., Añón, M.C., Scilingo, A., 2016. Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204–214.
- Sagardia, I., Iloro, I., Elortza, F., Bald, C., 2013. Quantitative structure–activity relationship based screening of bioactive peptides identified in ripened cheese. *International Dairy Journal*, 33(2), 184–190.

- Sagardia, I., Roa-Ureta, R.H., Bald, C., 2013. A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1370–6.
- Sahingil, D. Hayaloglu, A.A., Kirmaci, H.A., Özer, B., Simsek, O., 2014. Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in whitebrined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. *Journal of Dairy Research*, 81, 394–402.
- Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., Nokihara, K., 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorialchemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3668–74.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434–1440.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95, 243–9.
- Salampessy, J., 2010. Enzymatic production, purification and analysis of bioactive peptides from fish proteins. PhD Thesis submitted to University of Western Sydney, Australia.
- Sanchez, A., Vazquez, A., 2017. Bioactive Peptides: A Review. *Food Quality and Safety*, 1, 29–46.
- Santos, L.F., Koblitz, M.G.B., 2008. Proteases. In M.G.B. Koblitz (Ed.), *Bioquímica de Alimentos*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 78–103.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 394–406.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L.I., Willet, L. B., 1998. Milk borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 8, 393–403.

- Sforza, S., Cavatorta, V., Lambertini, F., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2012. Cheese peptidomics: a detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3514-3526.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-31.
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Bioautomation*, 15, 223-250.
- Sheih, I.C., Wu, T.K., Fang, T.J., 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, 100, 3419–25.
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y., Yamamoto, J., 2009. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*, 123(5), 753–757.
- Shin, Z.I., Yu, R., Park, S.A., Chung, D.K., Ahn, C.W., Nam, H.S., Kim, K.S., Lee, H.J., 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3004.
- Side, C., 2006. Overview on marketing functional foods in Europe. In *Functional food network general meeting*.
- Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B., Wechsler, D., 2010. ACE inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 90, 47-73.
- Silva, S. V., Malcata, F.X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1–15.
- Silva, S.V., Pihlanto, A., Malcata, F.X., 2006. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3336-3344.

- Silveira, S.T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Hernández-Ledesma, B., 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 2013, 141, 1072–1077.
- Singh, B.P., Vij, S., Hati, S., 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171–179.
- Singh, B.P., Vij, S., Hati, S., Singh, D., Kumari, P., Minj, J., 2015. Antimicrobial activity of bioactive peptides derived from fermentation of soy milk by *Lactobacillus plantarum* C2 against common foodborne pathogens. *International Journal of Fermented Foods*, 4(1-2), 91-99.
- Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianirad, M., 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Science & Technology*, 96(4), 443-457.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128–31.
- Sugiyama, M., Tang, A.C., Wakaki, Y., Koyama, W., 2003. Glycemic index of single and mixed meal foods among common Japanese foods with white rice as a reference food. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(6), 743–752.
- Tailor, C.S., Goyal, A., 2014. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4), 244-249.
- Takano, T., 1998. Milk derived peptides and hypertension reduction. *International Dairy Journal*, 8, 375–381.

- Temizkan, R., Yasar, K., Hayaloglu, A.A., 2014. Changes during ripening in chemical composition, proteolysis, volatile composition and texture in K ashar cheese made using raw bovine, ovine or caprine milk. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2643-2649.
- Thayer, A.M., 2011. Improving peptites. *Chemical and Engineering News*, 89,13–20.
- Théolier, J., Hammami, R., Fliss, I., Jean, J., 2014. Antibacterial and antifungal activity of water-soluble extracts from Mozzarella, Gouda, Swiss, and Cheddar commercial cheeses produced in Canada. *Dairy Science & Technology*, 94(5), 427-438.
- Timón, M.L., Andrés, A.I., Otte, J., Petró, M.J., 2018. Antioxidant peptites (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, 120, 643-649.
- Tirelli, A., De Noni, I., Resmini, P., 1997. Bioactive Peptides in Milk Products. *Italian Journal of Food Science*, 9 (2), 91-98.
- Tu, M., Feng, L., Wang, Z., Qiao, M., Shahidi, F., Lu, W., Du, M., 2017. Sequence analysis and molecular docking of antithrombotic peptides from casein hydrolysate by trypsin digestion. *Journal of Functional Foods*, 32, 313-323.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M.L., Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L., Nissinen, A., 2004. Effect of ingesting sour milk fermented by *Lactobacillus helveticus* bacteria on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 18, 795–802.
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., Nakajima, H., 2012. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*, 22(1), 24-30.

- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357–366.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., 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.
- Villén, J., Gygi, S.P., 2008. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 3(10), 1630–1638.
- Vilsbøll, T., Holst, J.J., 2004. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47(3), 357–366.
- Vizioli, J., Salzet, M., 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(11), 494–6.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M., 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, 15(1-2), 40–56.
- Walther, B., Sieber, R., 2011. Bioactive proteins and peptides in foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81, 181–191.
- Wang, J.Y., Fujimoto, K., Miyazawa, T., Endo, Y., 1991. Antioxidative mechanism of maize zein in powder model systems against methyl linoleate: effect of water activity and coexistence of antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 351–355.
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Li, P., 2017. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *BioMed Research International*, 1–16.
- Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. S., Stevens, J.F., 2016. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*, 192, 156–162.

- Wu, H.C., Pan, B.S., Chang, C.L., Shiau, C.Y., 2005. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 176–183.
- Wu, J., Aluko, R.E., Nakai, S., 2006. Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732-8.
- Wu, J., Ding, X., 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35 (4), 367-75.
- Wu, J., Majumder, K., Gibbons, K., 2010. Bioactive proteins and peptides from egg proteins. In: Mine Y.Li-Chan E.Jiang B., (eds), *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* . Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 247–263.
- Wyvratt, M.J., Patchett, A.A., 1985. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 5(4), 483-531.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111, 370–6.
- Yamamoto, N., 1997. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Peptide Science*, 43(2), 129-134.
- Yamamoto, N., Ejiri, M., Mizuno, S., 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1345-1355.
- Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T., 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82, 1388–1393.
- Yan, Q.J., Huang, L.H., Sun, Q., Jiang, Z.Q., Wu, X., 2015. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chemistry*, 179, 290-295.

- Yang, L., Zhang, L., Yan, L., Zheng, H., Lu, P., Chen, J., Dai, J., Sun, H., Xu, Y., Yang, T., 2017. Stability assessment of a new antithrombotic small peptide, Arg-Gly-Asp-Trp-Arg (RGDWR), and its derivative. *Biotechnology Letters*, 39(8), 1183–1190.
- Ye, X., Chen, M., Chen, Y., Su, X., Wang, Y., Su, W., Kong, Y., 2015. Isolation and characterization of a novel antithrombotic peptide from enzymatic hydrolysate of *Agkistrodon acutus* venom. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21(3), 343-351.
- Yim, M.H., Lee, J.H., 2000. Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju. *Food Science and Biotechnology*, 9, 253–7.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., Chen, F., 2012. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry*, 135(3), 2078-2085.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Wang, F., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., Chen, F., 2011. Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *Journal of Food Science*, 76(8), 1149-1155.
- Zambrowicz, A., Zelazko, M., Trziszka, T., 2011. Hen egg proteins: precursors of bioactive peptides. *Medycyna Weterynaryjna*, 67, 157–161.
- Zanutto-Elgui, M.R., Vieira, J.C.S., do Prado, D.Z., Buzalaf, M.A.R., de Magalhães Padilha, P., De Oliveira, D. Elg., Fleuri, L.F., 2018. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*.
- Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., Bakar, F. A., Philip, R., Saari, N., 2014. Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. *Food Research International*, 62, 726-734.

- Zhang, R., Zeng, Q., Deng, Y., Zhang, M., Wei, Z., Zhang, Y., Tang, X., 2013. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. *Food Chemistry*, 136, 1169.
- Zhang, X.X., Eden, H.S., Chen, X., 2012. Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. *Journal of Controlled Release*, 159, 2–13.
- Zhang, Y., Wang, N., Wang, W., Wang, J., Zhu, Z., Li, X., 2016. Molecular mechanisms of novel peptides from silkworm pupae that inhibit α -glucosidase. *Peptides*, 76, 45–50.
- Zhao, M., Wei, C., Yang, X., Zhou, J., Wang, J., Gu, F., Lei, T., Qin, Y., 2016. The milk-derived hexapeptide PGIPN inhibits the invasion and migration of human ovarian cancer cells by regulating the expression of MTA1 and NM23H1 genes. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1721–1729.

ÖZGEÇMİŞ

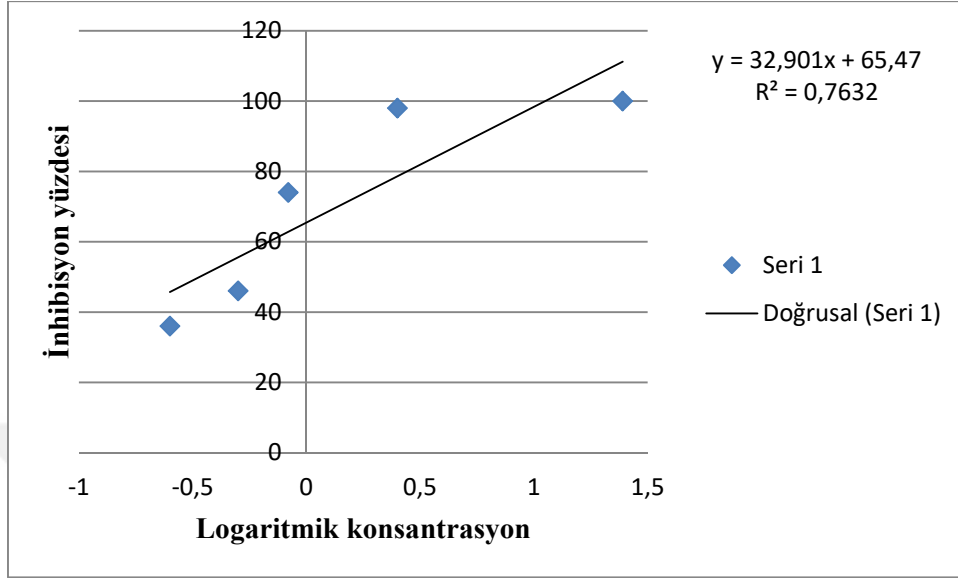
22 Eylül 1994 tarihinde Adana’da doğdu. İlk ve ortaokul eğitimini Dağcı İlköğretim Okulu’nda, Lise eğitimini İncirlik Lisesi’nde, Üniversite eğitimini ise Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü’nde tamamladı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve hala eğitime devam etmekte.



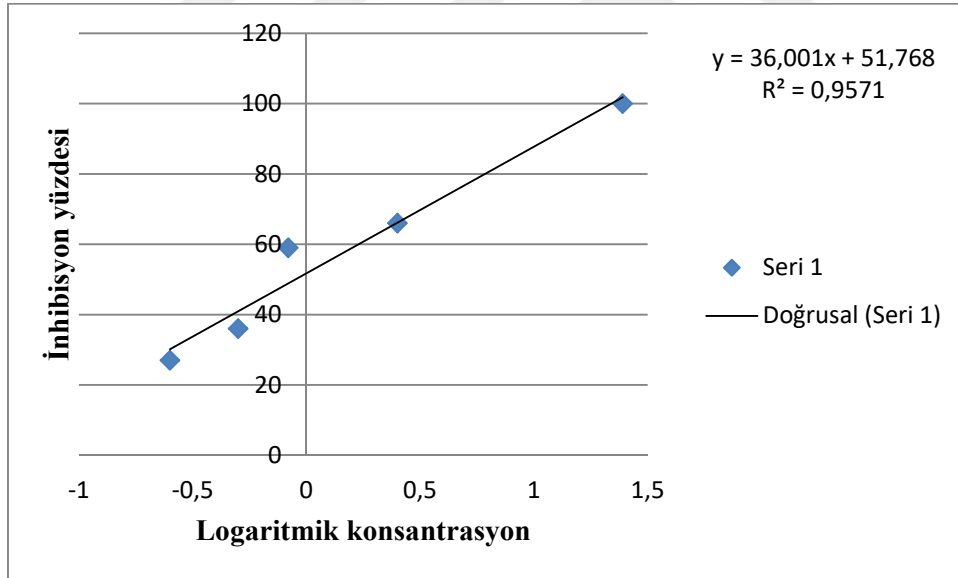


EKLER

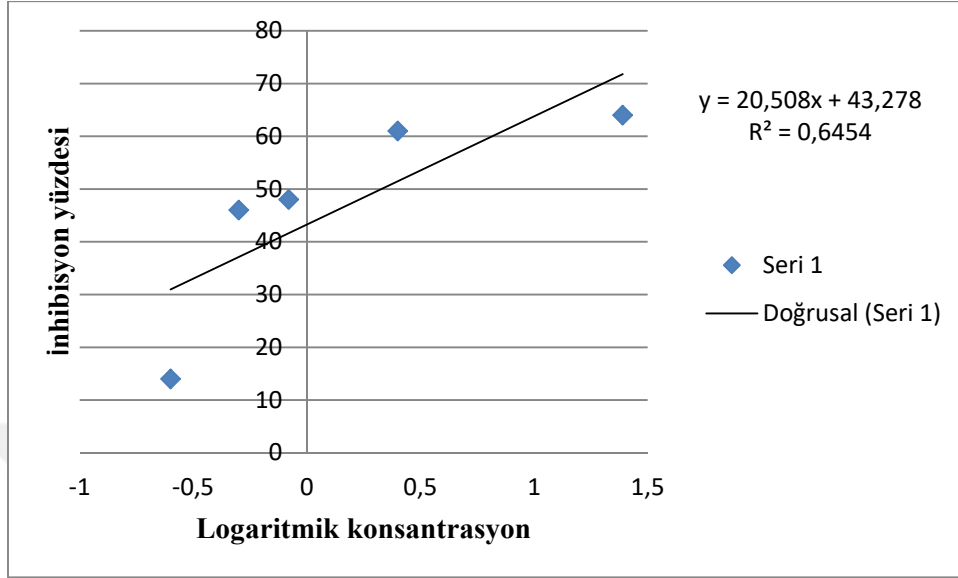




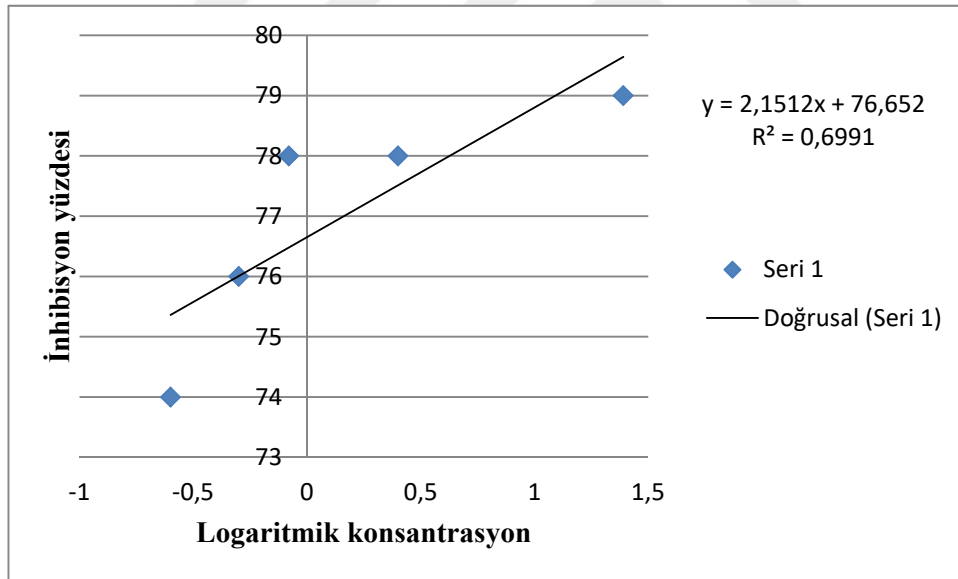
Ek Şekil 1. F₁ fraksiyonunun ADE enzimi üzerine inhibe etkisi



Ek Şekil 2. F₂ fraksiyonunun ADE enzimi üzerine inhibe etkisi



Ek Şekil 3. F₃ fraksiyonunun ADE enzimi üzerine inhibe etkisi



Ek Şekil 4. F₄ fraksiyonunun ADE enzimi üzerine inhibe etkisi