



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK BİYOAKTİVİTEYE SAHİP KAZEİN HİDROLİZATI
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE GIDA KATKI
MADDESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİ**

**ÖZLEM ÇELİK
DOKTORA TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK BİYOAKTİVİTEYE SAHİP KAZEİN HİDROLİZATI
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE GIDA KATKI
MADDESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİ**

**ÖZLEM ÇELİK
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZAFER ERBAY**

ADANA, 2025

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

04/02/2025

[İmza]

Özlem ÇELİK

ÖZET

YÜKSEK BİYOAKTİVİTEYE SAHİP KAZEİN HİDROLİZATI ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİ

Özlem ÇELİK

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zafer ERBAY

Şubat 2025, 134 sayfa

Biyoaktif peptitler, proteinlerin hidrolizasyonu ile elde edilmektedirler. Süt proteinlerinden kazein, biyoaktif peptitler açısından öncül bir kaynak olarak bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, yüksek biyoaktif peptit içeriğine sahip kazein proteinin maksimum aktivite değerlerinde optimum koşullarda üretilip gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. İlk olarak uygun endopeptidaz enzimine karar verilmiş (Alcalase[®], Neutrase[®] ve rTrypsin[®]) sonrasında biyoaktivite etkinliğini arttırmak amacıyla ekzopeptidaz enzim kombinasyonları denenmiştir. En uygun endopeptidaz 12 saat inkübasyonda Neutrase ultrases ön işlem uygulanan hidrolizat koşulları olarak belirlenmiştir (toplam peptit miktarı 258,0 mg Tripton / g örnek, antihipertansif potansiyel %77,6, antioksidan potansiyel 686,8 µmol Troloks / mL örnek, metal bağlama %31,4, alfa amilaz inhibisyonu %67,1, lipaz inhibisyonu %40,9). Ekzopeptidaz kullanımında Protana[™] Prime ve Flavourzyme[®] enzimlerinin eş zamanlı kullanılması uygun bulunmuştur (toplam peptit miktarı 447,2 mg Tripton / g örnek, antihipertansif potansiyel %50,5, antioksidan potansiyel 622,3 µmol Troloks / mL örnek, metal bağlama %34,1, alfa amilaz inhibisyonu %92,7, lipaz inhibisyonu %40,4). Optimizasyon faktörü olarak inkübasyon süresi, enzim konsantrasyonu ve ultrases süresi değerlendirilmiştir. En yüksek biyoaktivite değerleri 12 saat inkübasyon, 30 dakika ultrases ve 0,5 mL enzim konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen yüksek biyoaktivite değerlerine sahip hidrolizat ayran örneklerinde %1, %5 ve %10 oranında eklenerek 1., 7. ve 14. günlerde bileşim, duyusal ve biyoaktivite analizleri değerlendirilip sonuç olarak %1 ve %5 konsantrasyonları tercih edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ACE inhibisyon, ayran, biyoaktif peptit, kazein, optimizasyon, proteoliz, enzimatik hidroliz

ABSTRACT

OPTIMISATION OF PRODUCTION CONDITIONS OF CASEIN HYDROLYSATE WITH HIGH BIOACTIVITY AND ITS USABILITY AS FOOD ADDITIVE

Özlem ÇELİK

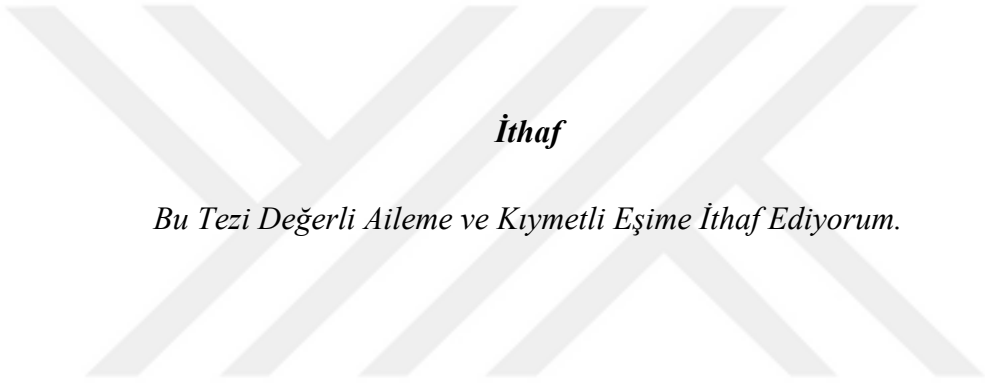
PhD, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Zafer ERBAY

February 2025, 134 pages

Bioactive peptides are obtained by hydrolyzation of proteins. Casein, one of the milk proteins, is known as a primary source of bioactive peptides. In this thesis, it was demonstrated that casein protein with high bioactive peptide content can be produced under optimum conditions with maximum activity values and can be used as a food additive. First, the appropriate endopeptidase enzyme was decided (Alcalase[®], Neutrase[®] and rTrypsin[®]) and then exopeptidase enzyme combinations were tried to increase the bioactivity. The most suitable endopeptidase was determined as hydrolysate conditions with Neutrase ultrasound pretreatment at 12 hours incubation (total peptide content 258.0 mg Tryptone/g sample, antihypertensive potential 77.6%, antioxidant potential 686.8 μmol Trolox/mL sample, metal binding 31.4%, alpha amylase inhibition 67.1%, lipase inhibition 40.9%). The simultaneous use of Protana[™] Prime and Flavourzyme[®] enzymes was found to be suitable for the use of exopeptidase (total peptide amount 447.2 mg Tryptone / g sample, antihypertensive potential 50.5%, antioxidant potential 622.3 μmol Trolox / mL sample, metal binding 34.1%, alpha amylase inhibition 92.7%, lipase inhibition 40.4%). Incubation time, enzyme concentration and ultrasonic time were evaluated as optimization factors. The highest bioactivity values were observed at 12 hours incubation, 30 minutes ultrasound and 0.5 mL enzyme concentration. Hydrolysate with high bioactivity values obtained under optimum conditions was added to ayran samples at 1%, 5% and 10% and composition, sensory and bioactivity analyses were evaluated on the 1st, 7th and 14th days and 1% and 5% concentrations were preferred as a result.

Keywords: ACE inhibition, ayran, bioactive peptide, casein, optimization, proteolysis, enzymatic hydrolysis



İthaf

Bu Tezi Değerli Aileme ve Kıymetli Eşime İthaf Ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım ve doktora eğitim süresince tüm bilgi birikimlerini paylaşp, yoluma ışık tutan ve her zaman her konuda destek veren tez danışmanım Prof. Dr. Zafer ERBAY’a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Bu tez “1200763” proje numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimime 100/2000 YÖK Doktora Bursu ile başladığım ve doktora süresince verdiği desteklerden dolayı Yükseköğretim Kurulu (YÖK)’na teşekkür ederim.

Tez jüri üyelerimde bulunan Doç. Dr. Levent Yurdaer AYDEMİR, Doç. Dr. Erdal AĞÇAM, Doç. Dr. Özge Süfer, Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN ve Dr. Öğr. Üyesi Sevgin DIBLAN hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Türkan UZLAŞIR, Hatice Kübra ŞAŞMAZ, Özge AKSAY ve Ceren ILGAZ’a arkadaşlıkları için teşekkürü borç bilirim. Beni her zaman yüreklendirip her aldığım kararda yanımda olan, ailem olmalarından her zaman gurur duyduğum 6 Şubat depreminde kaybettiğim canımın içi annem Hülya UĞURLU, canımın içi babam Recep UĞURLU ve canımın içi kardeşim Yaren UĞURLU’ya bugüne gelmemdeki desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca canımın içi ablam Özge YAPICI ve yeğenim Doğa YAPICI’ya desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Hayatıma girdiği andan itibaren beni hiç yalnız bırakmayan tüm adımlarımda yanımda ve arkamda olan canım eşim Özgür ÇELİK’e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
<i>İthaf</i>	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Süt ve Süt Ürünlerindeki Biyoaktif Peptitlerin İşlevleri	5
2.2. Biyoaktif Peptitlerin Elde Edilmesi	5
2.3. Sütte Bulunan Biyoaktif Peptitler ve Sağlık Üzerine Etkileri	8
2.3.1. Sindirim Sistemi Üzerindeki Etkiler	10
2.3.2. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi	11
2.3.3. Bağışıklık Sistemi ve Hastalıklar	13
2.3.4. Antihipertansif Peptitler	14
2.3.5. Antimikrobiyal Peptitler	15
2.3.6. Antioksidan Peptitler	16
2.3.7. Antidiyabetik ve Antiobezite Peptitleri	17
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanılan Hidroliz Enzimleri	20
3.2. Üretimler	21
3.2.1. Asit Kazein Eldesi	21
3.2.2. Asit Kazeinin Homojen Bir Dispersiyona Dönüştürülmesi	23
3.2.3. Kazein Hidrolizatı Üretimleri	24
3.2.4. Ayran Üretimi	25
3.3. Analizler	26
3.3.1. Toplam Peptit Miktarının Belirlenmesi	26

3.3.2.	Antioksidan Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi	27
3.3.3.	Antihipertansif Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi	28
3.3.4.	Antidiyabetik Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi	29
3.3.5.	Lipaz İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi	30
3.3.6.	Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	31
3.3.7.	Duyusal Analiz	31
3.4.	Deneysel Tasarım, İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon	32
3.4.1.	Çok Kriterli Karar Analizi (TOPSIS)	33
3.4.2.	Yanıt Yüzey Yöntemi ve Optimizasyon	34
3.4.3.	Örnekler Arasındaki Farkların İstatistiksel Olarak Belirlenmesi	36
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1.	Kazein Hidrolizatı Üretiminde Yüksek Biyoaktivite Sağlayan Endopeptidaza Karar Verilmesi	37
4.1.1.	İnkübasyon Koşullarının Belirlenmesi	37
4.1.2.	Endopeptidaz Türünün ve İşlem Koşullarının Hidrolizat Biyoaktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	39
4.1.2.1.	Hidrolizat Örneklerinin Toplam Peptit Miktarlarının Belirlenmesi	39
4.1.2.2.	Hidrolizat Örneklerinin Antioksidan Aktivite Sonuçlarının Belirlenmesi	42
4.1.2.3.	Hidrolizat Örneklerinin Antihipertansif Aktivite Sonuçlarının Belirlenmesi	45
4.1.2.4.	Antidiyabetik Aktivitenin Belirlenmesi	47
4.1.2.5.	Lipaz İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi	50
4.1.2.6.	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	51
4.1.3.	Uygun Endopeptidazın ve İşlem Koşullarının Belirlenmesi	55
4.1.3.1.	TOPSİS (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution) Yöntemi	55
4.1.3.2.	Antimikrobiyal Aktivite	57
4.2.	Kazein Hidrolizatı Üretiminde Ekzopeptidaz Kullanımının Etkisinin Belirlenmesi	60
4.2.1.	Biyoaktivite Özelliklerinin Değişimi	60
4.2.2.	Antimikrobiyal Potansiyelinin Değişimi	63
4.2.3.	Uygun Enzim Kombinasyonunun Belirlenmesi	67
4.3.	Yüksek Biyoaktiviteye Sahip Kazein Hidrolizatı Üretim Optimizasyonu ve İşlem Koşullarının Biyoaktivite Üzerine Etkileri	68
4.3.1.	Optimizasyon Faktörlerinin, Düzeylerinin ve Deneme Planının Belirlenmesi	69

4.3.2.	Optimizasyon Analiz Sonuçları ve Modelleme	70
4.3.3.	Optimizasyon ve Doğrulama	82
4.3.4.	Optimum Koşullarda Üretilen Örneğin Antimikrobiyal Potansiyeli	84
4.3.5.	İşlem Koşullarının Biyoaktivite Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	86
4.4.	Ayran Analizleri	91
4.4.1.	Ayran Bileşim Analizleri	91
4.4.2.	Ayran Biyoaktivite Analizleri	93
4.4.3.	Duyusal Değerlendirme	95
5.	SONUÇLAR	97
6.	ÖNERİLER	99
	KAYNAKÇA	100
	EKLER	116
	ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.	Asit kazein üretimi	22
Şekil 4.1.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarlarının inkübasyon süresi ile değişimi.....	40
Şekil 4.2.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının serbest radikal süpürme kapasitesi olarak antioksidan aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	43
Şekil 4.3.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının metal bağlama kapasitesi olarak antioksidan aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	45
Şekil 4.4.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının ACE inhibisyon yüzdelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	46
Şekil 4.5.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyon yüzdelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	49
Şekil 4.6.	Farklı enzimler ve ultrases önişlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının lipaz inhibisyon yüzdelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	50
Şekil 4.7.	Üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	53
Şekil 4.8.	Üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	54
Şekil 4.9.	Yüksek biyoaktiviteye sahip farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (Alcalase®+US, Neutrase®+US ve Neutrase®) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	59
Şekil 4.10.	Yüksek biyoaktiviteye sahip farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (Alcalase®+US, Neutrase®+US ve Neutrase®) <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	59

Şekil 4.11. Farklı ekzopeptidaz kombinasyonlarının da hidrolizde kullanılması ile üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarı ile farklı biyoaktif özellikleri. Tüm örnekler ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime; NF:Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime.....	62
Şekil 4.12. Ekzopeptidaz enzimlerinin de kullanımı ile üretilen farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (N, NP, NF ve NFP) <i>S. aureus</i> ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	65
Şekil 4.13. Ekzopeptidaz enzimlerinin de kullanımı ile üretilen farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (N, NP, NF ve NFP) <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi	67
Şekil 4.14. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin serbest radikal süpürme kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi	76
Şekil 4.15. İnkübasyon süresi ile ekzopeptidaz konsantrasyonunun metal bağlama kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi	78
Şekil 4.16. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin metal bağlama kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	79
Şekil 4.17. İnkübasyon süresi ile ultrases süresinin ACE inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi.....	80
Şekil 4.18. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin ACE inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği	81
Şekil 4.19. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin α -amilaz inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi	82
Şekil 4.20. Optimum üretim koşulları belirlenen yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatlarının farklı konsantrasyonlarındaki <i>E.coli</i> türüne karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi.....	85

Şekil 4.21. Optimum üretim koşulları belirlenen yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatlarının farklı konsantrasyonlarındaki *S.aureus* türüne karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi..... 86



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarları ve antihipertansif ve antioksidan aktivite sonuçları	41
Tablo 4.2. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının antidiyabetik ve lipaz inhibisyon aktiviteleri analizlerinin sonuçları.....	48
Tablo 4. 3. Şekil 4.7’de ve Şekil 4.8’de verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri	52
Tablo 4.4. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen göreceli yakınlık değerleri.....	56
Tablo 4.5. Şekil 4.9’da ve Şekil 4.10’da verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri	58
Tablo 4.6. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarları, antihipertansif ve antioksidan aktivite sonuçları	61
Tablo 4.7. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri sonuçları	61
Tablo 4.8. Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.’de verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri	66
Tablo 4.9. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen göreceli yakınlık değerleri.....	68
Tablo 4.10. Optimizasyon amacıyla üretilen kazein hidrolizatlarının analiz sonuçları	71
Tablo 4.11. ANOVA sonucunda, her bir yanıt için elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler	73
Tablo 4.12. ANOVA sonucunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamli olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).....	75
Tablo 4.13. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması	84
Tablo 4.14. Şekil 4.20’de ve Şekil 4.21’de antimikrobiyal aktivite verilerinin temsil ettiği örnek bilgileri	85
Tablo 4.15. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla kullanılan deneme deseni	87
Tablo 4.16. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla üretilen kazein hidrolizatlarının analiz sonuçları	87

Tablo 4.17. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkileri	89
Tablo 4.18. Optimum koşullarda üretilen ve yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin protein, pH ve titrasyon asitlik analiz sonuçları	92
Tablo 4.19. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarı, ABTS katyon radikal süpürme kapasitesi ve metal bağlama kapasite analizlerinin sonuçları	94
Tablo 4.20. Optimum koşullarda üretilen ve yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin duyusal analiz analiz değerlendirmeleri	96



KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BMI	: Body mass index
CCRD	: Central Composite Rotatable Design
dk	: Dakika
DNS	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DPP-IV	: Dipeptidil Peptidaz IV
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
h	: Saat
IPP	: İzolösin-Prolin-Prolin
Kg	: Kilogram
KOB	: Koloni Oluşturma Birimi
LDL	: Low Density Lipoprotein
mL	: Mililitre
N	: Neutrase
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Hidrojen Fosfat
NF	: Neutrase + Flavourzyme
NFP	: Neutrase + Protana + Flavourzyme
NP	: Neutrase + Protana
OPA	: Ortoftalaldehit
pNPP	: P-Nitrofenil Fosfat
RSM	: Response Surface Methodology
TOPSIS	: Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution
TPM	: Toplam Pepetit Miktarı
US	: Ultrases
VVP	: Valin-Prolin-Prolin

1. GİRİŞ

Son 30 yılda ortaya çıkan fonksiyonel gıdalar ve biyoaktif bileşenler, gıda bilimcilerinin ve beslenme uzmanlarının yanı sıra tüketicilerin de dikkatini çekmiş ve dikkat çekmeye de devam etmektedir. Bu yeni gıda kategorilerinin ortaya çıkışı, gıda ve belirli gıda bileşenlerinin insan sağlığı üzerindeki metabolik ve genomik etkileri hakkındaki bilimsel bilginin artmasıyla kolaylaşmıştır. Gıda alanındaki bu yaklaşım ve ilginin temel nedeni olarak sağlık ve beslenme alanlarındaki bilimsel gelişim, güvenli ve sağlıklı gıdaya yönelik tüketici talepleri, yaşlanan nüfus, sağlık hizmetlerinin artan maliyetleri, gıda endüstrisinde gerçekleşen teknolojik ilerleme, çevre ile ilgili değişen düzenlemeler ve gelişen çevreci yaklaşımlar gösterilebilir. Beslenme ve gıda üretimleri, yalnızca hayatın sürdürülebilmesi için gerekli olan ihtiyaçları sağlamakla kalmaz sağlığın korunması ve yaşam kalitesinin artırılması konusunda da önemli bir araç olarak karşımıza çıkar. Bu kapsamda gıda ve beslenme üzerine yapılan değişikliklerin, bireyleri hem hastalıklardan korunması hem de kişilerin genel sağlık durumlarını iyileştirmesi beklenmektedir (Chourasia ve diğerleri, 2022; Jakopović ve diğerleri, 2019; Korhonen, 2002; Ozen ve diğerleri, 2012; Siro ve diğerleri, 2008).

Fonksiyonel gıdalar, “vücutta bir veya daha fazla hedef fonksiyonu olumlu bir şekilde etkileyen ve bu şekilde yeterli/uygun besleyici etkilerin ötesinde, bireyin sağlığında, fiziksel performansında veya ruhsal durumunda olumlu etki yaratan gıdalar” olarak tanımlanmaktadır (Diplock ve Action, 1999). Fonksiyonel gıda teknolojileri, biyoteknoloji ve farmakoloji gibi disiplinlerin bir araya gelmesiyle daha da gelişmiştir. Bu alanlardaki ilerlemeler, gıda ürünlerinin yalnızca besin değeri taşıyan maddelerden ibaret olmanın ötesine geçerek, sağlığı destekleyici ve hastalıkları önleyici özelliklere sahip mümkün kılmaktadır. Bu dönüşüm, kronik hastalıkların yaygınlaşması ve sağlık bilincinin artması gibi küresel süreçlerle ve eğilimlerle doğrudan ilişkilidir. Ayrıca fonksiyonel gıda, genel sağlık durumunu iyileştirmeye yönelik olarak, besinlerin içeriğine eklenen veya doğal olarak bulunan biyoaktif bileşenlerin etkili şekilde kullanılması şeklinde tanımlanabilir.

Bu tür gıdalar, yalnızca temel besin ihtiyaçları karşılamakla kalmaz, aynı zamanda vücuttaki belirli biyolojik süreçlere müdahale ederek, örneğin bağışıklık sistemini güçlendirerek, sindirim sağlığını iyileştirerek, kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltarak ya da nörolojik

bozuklukların etkilerini hafifleterek sağlık üzerinde daha geniş çaplı faydalar sağlamaktadır (Clare ve Swaisgood, 2000; Korhonen, 2009; Ünal ve diğerleri, 2018). Bu tanıma göre fonksiyonel gıdalar, doğal veya farklı teknolojik uygulamalar ile fonksiyonelliği arttırılmış/sağlanmış gıdalardır. Özellikle beslenme ve sağlığa olan etkileri bakımından gıdalara fonksiyonel özellik kazandıran biyoaktif bileşenler bu konuda belirleyici olarak görev almaktadır.

Biyoaktif gıda bileşenleri içerisinde önemli bir grubu biyoaktif peptitler oluşturmaktadır. Biyoaktif peptitler ana protein dizileri içerisinde aktif değildir. Fakat enzimatik, kimyasal ve mikrobiyal hidroliz yoluyla çok çeşitli fizyolojik etkiler gösterebilmektedirler. Bu peptitlerin amaçlanan işlevlere sahip şekilde elde edilmesinde kullanılan en etkili ve güvenilir yöntemin enzimatik sindirim olduğu bilinmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010). Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonlarını veya sağlık koşullarını olumlu yönde etkileyen 2-20 aminoasit dizisinden oluşan protein fragmentleri olarak tanımlanmıştır (Kitts ve Weiler, 2003). Bu bileşenler yapısal özelliklerine, aminoasit bileşimine, dizilimine ve yüklerine bağlı olarak çeşitli biyolojik özellikler göstermektedirler (Ay ve Şanlı, 2018; Karami ve Akbari-Adergani, 2019; Kınık ve Gürsoy, 2002; Korhonen ve Pihlanto, 2003; Marciniak ve diğerleri, 2018).

Gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin başlıca ana kaynakları olarak süt, yumurta, tahıl, balık, et gibi protein miktarı yüksek gıdalar gösterilmektedir. Fakat biyoaktif peptit en yaygın olarak süt ve süt türevlerinden üretilmiştir. Bu peptitler, proteinlerin yapısında inaktif şekilde bulunur. İnaktif durumdaki biyoaktif peptitler, sindirim sistemindeki proteolitik enzimler, starter kültürlerde bulunan enzimler veya dışarıdan ilave edilen enzimlerin etkisiyle aktifleşmektedir (Hartmann ve Meisel, 2007). Gıda kaynaklı biyoaktif peptitleri elde etmek için genel olarak pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi pankreastan salgılanan sindirim sistemi enzimleri kullanılmaktadır (Korhonen, 2009). Süt proteinleri biyoaktif peptitlerin kaynağı olarak, proteinlerinin yaklaşık %80'ini oluşturan kazein (α_{s1} , α_{s2} , β - ve κ -kazein) ve geri kalan %20'sini oluşturan serum proteinleri (serum albümini, β -laktoglobulin, α -laktalbumin, immunoglobülinler, laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrin) içermektedir (Haque ve diğerleri, 2008). Serum proteinlerinin biyoaktif peptit üzerine çok çalışmaları bulunsu da, kazein proteini biyoaktif peptit açısından öncül bir protein olarak değerlendirilmektedir. Kazein, kendi arasında alfa-S1- ve alfa-S2-kazeinler, beta-kazein ve kappa-kazein fraksiyonlarından oluşmaktadır.

Kazein içerisinde bulunan β -kazein, A1 ve A2 olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bazı çalışmalar, β -kazein A1 türünün, farklı sağlık sorunlarıyla bağlantılı olabileceğini göstermektedir (Andiç ve diğerleri, 2021; Auestad ve Layman, 2021; Haq ve diğerleri, 2014). Son yıllarda, kardiyovasküler hastalıklar, tip 1 diyabet, otizm, şizofreni gibi sağlık sorunları ve ani bebek ölümleri gibi durumların, β -kazein, A1 ve A2 türlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Bell ve diğerleri, 2006; Miluchová ve diğerleri, 2016). A1, A2 ve β -kazeinler, genel olarak pek çok hastalığın potansiyel sebepleri olarak görülse de, bazı çalışmalar yalnızca A1 β -kazeinin bu tür sağlık sorunlarına yol açtığını, A2 β -kazeinin ise bu tür etkiler göstermediğini ileri sürmektedir (Kılıç ve Fıncıoğlu, 2021; Swinburn, 2004). Bu proteinlerin birçoğu farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca, son yıllarda, proteinlerin birincil amino asit dizilerinde şifrelenmiş olan ve sindirim sırasında amino asitlerle birlikte salınan peptitler, giderek daha fazla biyolojik olarak aktif protein metabolitleri olarak tanınmaktadır ve bunların insan sağlığı üzerinde faydalı etkiler yaratabileceği düşünülmektedir (Auestad ve Layman, 2021; Kılıç ve Fıncıoğlu, 2021).

Bu biyoaktif peptitlerin biyolojik aktivitesi, aminoasitlerin türüne, zincir uzunluğuna ve dizilimlerine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Beermann ve Hartung, 2013). Biyoaktif peptitler, gıdalardan yada sindirim enzimleriyle vücuda alınarak etki göstermektedir. Daha sonrasında bağırsağa ulaşır ve emilerek ardından kan dolaşımına katılır ve organlara ulaşır (FitzGerald ve Meisel, 2003; Kitts ve Weiler, 2003).

Son zamanlarda, biyoaktif süt bileşenlerinin fraksiyonlanması ve pazarlanması, süt ürünleri sektörü ve ilgili sektörler için yeni ve kazançlı bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Bu bileşenlerin birçoğu hem süt hem de süt ürünü olmayan gıda formülleri ve hatta ilaç formülasyonlarında kullanılmaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2007; Krissansen, 2007; Playne ve diğerleri, 2003; Shah, 2000). Süt endüstrisi, fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde öncü bir rol oynamış ve ayrıca bu ürünleri ticarileştirmiştir.

Çalışmanın amacı, süttten elde edilen yüksek biyoaktif peptit kazein hidrolizatının optimum koşullarda elde edilmesine ve elde edilen ürünün gıdalarda fonksiyonel özelliklerini geliştiren katkı maddesi olarak kullanılmasına dayanmaktadır. Bu özelliklerin ultrases koşullarında etkileri de incelenmiştir. Bu bağlamda kazeinin optimum koşullarda üretim koşullarının

sağlanması amacı, biyoaktivite etkinliğinin artırılması ve maksimize edilmesidir. Daha özgün hedef ise, yüksek biyoaktivite değerlerine sahip kazein hidrolizatlarının doğal bir gıda katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Bu amaçla üretilen hidrolizatlar gıda matrisi içerisinde kullanılıp duyuşal test değeriendirmeleri yapılmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Süt ve Süt Ürünlerindeki Biyoaktif Peptitlerin İşlevleri

Dünya çapında en yaygın tüketilen ürün gruplarından birisi olan süt ve süt ürünleri, besin değerlerinin yanı sıra içeriğinde bulunduğu bildirilen biyoaktif bileşenler ve bu bileşenlerin işlevsel özellikleri ile de öne çıkmaktadır ve bu kapsamda literatürde çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Park, 1990, 2009b). Buna karşın, sütlerde sözü edilen bu biyoaktif bileşenlerin genel olarak düşük konsantrasyonlarda bulunması, biyokimyasal yapılarının karmaşıklığı, kimi bileşenlerin özel yapıları nedeniyle belirlenebilmesi veya ölçülebilmesi için özel yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulması, laktasyon sürecinin uzunluğu gibi çok çeşitli faktörlerin bu bileşenlerin konsantrasyonları veya işlevleri üzerine etkileri gibi nedenlerle belirtilen biyoaktif bileşenlerin süt ve süt ürünlerinde incelenmesi konusunda zorluklar bulunmaktadır (Goldman ve Goldblum, 2007; Park, 2009a). Süt ve süt ürünlerindeki biyoaktif bileşenler arasında, biyoaktif peptitler bu konuda en çok çalışılan bileşenlerdir. Çeşitli diyet proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptitler birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Clare ve diğerleri, 2003; FitzGerald ve Meisel, 2003; Li ve diğerleri, 2004). Biyoaktif peptitler ana protein dizisi içinde inaktiftir ve üç şekilde ortama salınarak aktif hale geçebilirler: (i) sindirim enzimleri tarafından proteinlerin hidrolizi yoluyla, (ii) proteolitik mikroorganizmalar tarafından proteinlerin hidrolizi yoluyla ve (iii) farklı kaynaklardan elde edilmiş proteolitik enzimlerin ilavesiyle proteinlerin hidrolizi yoluyla (Korhonen ve Pihlanto, 2007). Kazein proteini bu kapsamda en çok çalışılan proteinlerden birisidir ve kazeinin hidrolizi ile antihipertansif, immünomodülatör, antioksidan, antimikrobiyal ve antialerjik özellikler gösteren peptitlerin açığa çıktığı bilinmektedir.

2.2. Biyoaktif Peptitlerin Elde Edilmesi

Peptitlerin amaçlanan işlevlere sahip şekilde elde edilmesinde kullanılan en etkili ve güvenilir yöntemin enzimatik sindirim olduğu belirtilmiştir (Kim ve Wijesekara, 2010). Biyoaktif peptitleri açığa çıkarmak için yaygın olarak pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi pankreastan salgılanan sindirim sistemi enzimleri kullanılmaktadır (Korhonen, 2009).

Protein hidrolizi için kullanılan yöntemler, genellikle protein kaynağına bağlı olarak değişir. Her bir protein türü, kimyasal, enzimatik veya mikrobiyal hidroliz yöntemlerine farklı tepkiler

verebilir, bu nedenle hidroliz yöntemi seçimi, protein kaynağının yapısal özelliklerine ve elde edilmek istenen ürünün gereksinimlerine göre belirlenmelidir (Hou ve diğerleri, 2022). Örneğin; keratin yapısına sahip proteinler, genellikle asidik veya alkali işlemlerle gerçekleştirilen kimyasal hidroliz yöntemleriyle işlenirken; kazein ile peynir altı suyu gibi süt proteinleri ve bitkisel proteinler, çoğunlukla enzimatik ve mikrobiyal hidroliz yöntemleriyle hidrolize edilmektedir. Fermantasyon, enzimatik hidroliz ve gastrointestinal sindirimin taklit edilmesi, protein hidrolizinde başvuru olan önde gelen biyolojik yöntemler olmakla beraber, biyolojik olarak aktif peptitlerin elde edilmesi için de enzimatik hidroliz en yaygın tercih edilen yöntemdir. Enzimatik hidroliz yöntemi ile proteinlerin sindirilebilirliği ile çözünürlüğünü artırmak ve aynı zamanda alerjenik özelliklerini azaltmak da mümkündür (Chakrabarti ve diğerleri, 2018; Hou ve diğerleri, 2022; Mazorra-Manzano ve diğerleri, 2018).

Enzimatik hidrolizin ön plana çıkmasının birkaç önemli nedeni bulunmaktadır. İlk olarak, laboratuvar ortamından daha büyük ölçeklere geçişi son derece kolaydır, bu da endüstriyel üretim süreçlerinde büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, enzimatik hidroliz genellikle kısa reaksiyon süreleri gerektirir ve bu da zaman açısından verimlilik sağlar. Mikroorganizmaların aksine, enzimatik hidroliz daha iyi kontrol edilebilen bir ortamda gerçekleşir ve bu da işlem parametrelerinin optimize edilmesi ile ürün kalitesinin yüksek tutulmasını mümkün kılar. Diğer bir önemli avantaj ise, belirli biyoaktivitelere sahip çok özel peptitlerin hedeflenerek üretilmesini de olanak sağlamasıdır. Bu nitelik, özellikle sağlık ve beslenme alanlarında talep gören biyolojik olarak aktif peptitlerin üretiminde büyük önem taşımaktadır (Chakrabarti ve diğerleri, 2018). Bu faktörler, enzimatik hidrolizi biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda daha cazip ve verimli bir seçenek haline getirmektedir. Enzimatik hidroliz yöntemlerinde kullanılan enzimler, hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal olmak üzere üç farklı ana kaynaktan elde edilebilmektedir. Hayvansal kaynaklı enzimler arasında pankreatin, tripsin, pepsin, karboksipeptidaz ve aminopeptidaz yer alırken, bitkisel kaynaklı enzimler arasında papain ve bromelain gibi proteazlar bulunur. Ayrıca, mikrobiyal kaynaklı enzimler, özellikle bakteri ve mantar gibi organizmalardan elde edilen enzimler, geniş bir aktivite aralığı sunarak farklı koşullarda hidroliz işlemleri gerçekleştirilmesine sebep olmaktadır (Chakrabarti ve diğerleri, 2018; Lorenzo ve diğerleri, 2018).

Magalhaes ve diğeri (2022) 3 farklı proteaz kullanarak (Alcalase®, Flavourzyme® ve Brauzyne) keçi sütü kazeininde hidroliz etkilerine bakmak amacıyla ultrases işlemi kullanmışlardır. Sabit sıcaklıkta 300 dakikalık hidroliz sonrasında işlem performansı, reaksiyon hızı, hidroliz derecesi ve çözünürlük hidrolizatların antioksidan aktivitesine göre değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmaya göre ultrases tüm enzimler için, hidroliz hızında %120'ye kadar, hidroliz derecesinde %23-48 aralığında ve küçük peptit oluşumunda %40 oranında artış sağlamıştır. Ayrıca, *in vitro* analiz olarak özellikle Alcalase® enzimi ABTS katyon radikal süpürme kapasitesi sonuçlarının DPPH antioksidan aktivite sonuçlarından daha yüksek süpürme aktivitesini sağladığı ifade edilmiştir. Ayrıca ABTS katyon radikal süpürme kapasitesi analizlerine göre antioksidan peptitlerin üretimini is 10 kat daha arttırdığı gösterilmiştir (Magalhães ve diğeri, 2022). Madadlou ve diğeri (2011) ise, nanokapsüle edilmiş fungal proteaz kullanarak ve hidroliz sürecinde ultrases desteği uygulayarak elde ettikleri kazein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. Çalışmada ultrases desteğinin ACE inhibitör aktivitesini etkilemediği fakat hidroliz süresini 6 kat arttırdığı gözlemlenmiştir (Madadlou ve diğeri, 2011).

Uluko ve diğeri (2013) ultrason ve mikrodalga ön işlemlerine tabi tuttıkları süt proteinlerinde hidroliz kinetiği ve derecesi, protein çözünürlüğü, acılık ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitör aktivitesi gibi parametrelerin nasıl değiştiklerini incelemişlerdir. Alcalase®, rTyrosin®, Neutrase®, alkalın proteaz ve Flavourzyme® enzimlerinin kullanımı hidrolizasyonu sağlanan proteinlerde uygulanan ön işlemler hidroliz derecesini arttırmış ve hidrolizatların çözünürlüğünü stabilize etmiş, ancak hidrolizatların acılığını önemli ölçüde azaltamamıştır. Hidrolizatların anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitör aktivitesi, ultrason ön işlemi uygulanmış Neutrase hidrolizatları ile geliştirilmiştir (Uluko ve diğeri, 2013).

Gerçekleştirilen literatür taraması sonucu ultrasonik ön işlem prosesinin kazein proteinlerinin hidrolizatlarında hem hidrolizasyon hızına hem de biyoaktif özelliklerine desteğinin olduğu görülmüş, bu sebeple bu çalışmada da ultrases ön işlemi uygulanmış ve sonuçlarının farklı enzimlerdeki farklı biyoaktivite değerleri değerlendirilmiştir.

2.3. Sütte Bulunan Biyoaktif Peptitler ve Sağlık Üzerine Etkileri

Günümüzde, biyoaktif kazein peptitleri, fonksiyonel gıda ürünlerinde sıkça kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünleri, biyoaktif bileşenleri sayesinde yalnızca besleyici olmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sağlık yararları da sunar. Özellikle sporcu gıdaları, probiyotik ürünler, antihipertansif içeriğe sahip süt ürünleri ve diyet takviyeleri, biyoaktif kazein peptitlerinin kullanıldığı başlıca alanlar arasında yer almaktadır. Biyoaktif kazein peptitlerinin faydalarının yanı sıra, aşırı tüketiminin bazı olumsuz etkileri de olabilir. Özellikle süt alerjisi olan bireylerde kazein, ciddi alerjik reaksiyonlara yol açabilir. Ayrıca, bazı çalışmalarda, aşırı miktarda kazein tüketiminin, böbrek fonksiyonları üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği ve sindirim problemlerine yol açabileceği belirtilmiştir (Gobbetti ve diğerleri, 2002).

Farklı süt ürünlerinde çeşitli aktivite gösteren biyoaktif peptitler tespit edilmiştir. Özellikle peynirin üretimi ve olgunlaşma sırasında elde edilen biyoaktif peptitlerin tat, aroma ve tekstüre katkı sağladığı bilinmektedir. Biyoaktif peptitlerin ürüne sağladığı bu yararlar haricinde insan sinir sistemi, sindirim sistemi, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemi gibi olumlu yönden etkilediği bildirilmiştir (Gobbetti ve diğerleri, 2002; Sánchez-Rivera ve diğerleri, 2014; Timón ve diğerleri, 2014). Biyoaktif peptitler, vücutta gastrointestinal lümen aracılığıyla emildikten sonra kan dolaşımına katılarak hedef organ veya sisteme ulaşır. Serbest bırakılan biyoaktif besin peptitleri, ince ve kalın bağırsakta çeşitli düzeylerde biyoaktivite göstermektedir. Protein hidrolizatları ve peptitleri, genellikle temel proteinlere göre daha yüksek biyoaktivite sergiler. Peptitlerin enterositlerden emiliminde ve hedef dokularda biyoyararlanımında, hidroliz için kullanılan enzimler, işlem koşulları ve peptitlerin boyutu gibi pek çok faktör önemli bir rol oynamaktadır. Farklı enzimler kullanılarak aynı kaynak proteinden, çeşitli fizyolojik gereksinimlere uygun biyolojik işlevlere sahip biyoaktif peptitler elde edilmektedir. Genellikle, bu peptitlerin hastalıklara karşı etkileri, sentetik peptidomimetik bileşikler ve ilaçlardan daha düşük olmasına karşın, biyoaktif besin peptitlerinin güvenli, düşük maliyetli ve temel amino asitlerin kaynağı olmaları nedeniyle birçok fayda ve avantaj sundukları söylenebilir (Yalçın ve Rakıcıoğlu, 2020). Biyoaktif peptitlerin, iştahı baskılama yetenekleri sayesinde aşırı kilo alımını önleyerek obezite ile mücadelede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle, diyetlerde yer alan peynir altı suyu proteinlerinin, LDL kolesterol seviyelerini düşürmeye ve iştah düzenleyici hormonlardan biri olan kolesistokininin salınımını artırmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Özdemir ve diğerleri, 2021; Zhang ve Beynen, 1993).

Son dönemlerde, kazein ve serum proteinlerinden türetilen biyoaktif peptitlerin, sinir sistemi, sindirim sistemi, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sisteminin işleyişinin düzenlenmesine yardımcı olduğunu gösteren araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Barac ve diğerleri, 2016; Beermann ve Hartung, 2013; Bulca ve Güvenç, 2020). Süt proteinleri, pek çok farklı biyoaktif peptit türü içermektedir. Fermantasyon işlemi sırasında süt ürünlerinde yer alan *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve süt ürünleri üretiminde kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ile *Streptococcus thermophilus* gibi probiyotik bakteriler, biyoaktif peptitlerin oluşumunda kritik bir rol oynamaktadır. Peynir gibi fermente süt ürünlerinde biyoaktif peptitlerin oluşumu, süte eklenen laktik asit bakterileri, rennet enzimi ve sütte doğal olarak bulunan plazmin aracılığıyla gerçekleşir. Buna ek olarak, süt protein hidrolizatlarında, fermente süt ürünleri ile peynir çeşitlerinin protein bileşiminde de biyoaktif peptitler gözlemlenmiştir (De Moreno de LeBlanc ve Perdigon, 2005; Korhonen, 2009). Mozerella peyniri ve peynir altı suyu proteinlerinde kanser hücrelerinin gelişimini baskılayıcı bir özellik gözlemlenmiştir (De Simone ve diğerleri, 2009). Farklı bir çalışmada ise peynirin olgunlaşma sürecinde α - ve β -kazein protein bileşiminde yer alan biyoaktif peptitlerin antioksidan etkiye sahip düşük moleküler ağırlıklı parçalanması ile oluşan hidrolizatların varlığını tespit etmişlerdir (Barac ve diğerleri, 2016). β -laktoglobülinden proteininden elde edilen peptitlerin ACE inhibitör aktivite, antitrombotik, opioid aktivite, antimikrobiyal aktivite ve kolesterol düzenleyici etki gibi yeteneklere sahip olduğu da bilinmektedir (Ebringer ve diğerleri, 2008; Tidona ve diğerleri, 2009). Süt ürünlerinde bulunan probiyotik laktik asit bakterilerinin proteoliz sonrasında oluşan biyoaktif peptitlerin immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antifungal ve antikanserojen gibi aktiviteler ile sağlığı olumlu yönde etkileyen özellikler gösterdiği belirlenmiştir (Mishra ve diğerleri, 2008; Picard ve diğerleri, 2005). Peptit içeren bazı üretimler, kilo kaybını önlemek, bağışıklık sistemini desteklemek, kemik güçlendirme ve kardiyovasküler sistemin gelişmesi için ticari olarak sunulmaktadır. Örnek olarak Calpis, sütün *L. helveticus* CP790 ve *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilmesi sonucu oluşan VVP ve IPP (Valin-Prolin-Prolin ve İzolösin-Prolin-Prolin) tripeptitlerini içerir. Farelerde yapılan deneylerde, bu tripeptitlerin güçlü antihipertansif etkiler gösterdiği, ancak insanlarda daha düşük bir etki sağladığı gözlemlenmiştir. (Tidona ve diğerleri, 2009). Bulgular, biyoaktif peptitlerin genel olarak sağlık üzerinde iyileştirici etkilerin bulunduğunu ve kronik hastalıkların gelişmesine belirgin şekilde engel olduğu ortaya

koymaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006). Biyoaktif peptitlerin sağlık etkileri sindirim, bağışıklık ve kardiyovasküler sistemler gibi farklı kategorilerde incelenebilir.

2.3.1. Sindirim Sistemi Üzerindeki Etkiler

Biyoaktif peptitler, kısa zincirli ve doğal protein molekülleri olup, mide ve pankreas proteazları, fırçamsı yüzeyde bulunan proteazlar ve sitozolik plazma proteazları tarafından sindirim ve bozulmaya karşı hassasiyet göstermektedir. Bu durum, biyoaktif peptitlerin gastrointestinal sistemde proteinlerin sindirilmesi sırasında ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Besinlerdeki proteinler mideye ulaştığında denatüre olur ve hidroklorik asit ile pepsin etkisiyle kısmi bir parçalanma gerçekleşir, böylece biyoaktif peptitler oluşur. Örneğin, sütteki peptitler çoğunlukla pepsin, tripsin veya kimotripsin gibi proteaz enzimleri aracılığıyla kazein denatürasyonu ile açığa çıkmaktadır (Chew ve diğerleri, 2019; Panchaud ve diğerleri, 2012; Sultan ve diğerleri, 2018; Yalçın ve Rakıcıoğlu, 2020). Biyoaktif peptitlerin sindirim sistemi üzerindeki pozitif etkileri arasında, bağırsak hareketlerinin düzenlenmesi ve gastrik boşalma sürecine olan katkıları bilinmektedir (Pihlanto-Leppälä, 2000; Tirelli ve diğerleri, 2000).

Kazeinofosfopeptit olarak adlandırılan biyoaktif peptitler α_{s1} -, α_{s2} - ya da β -kazeinin sindirimi sonucu ortaya çıkarlar. Yüksek konsantrasyondaki kazeinofosfopeptitlerin negatif yükleri, bu peptitlerin proteolize karşı arttırılmış bir direnç göstermelerini sağlar. Özellikle, yan zincirlerde bulunan fosfat gruplarındaki negatif yükler, minerallerin bağlanmasına olanak tanıyan bir bağlanma alanı oluşturur. Fosfat gruplarında bulunan negatif yüklerin oluşturduğu bu alanlar kalsiyum, magnezyum ve demir gibi makro ve bakır, selenyum nikel gibi mikro elementlerin bağlanmasını sağlar. Bu sebeple kemik rahatsızlıkları, dişteki çürükler, tansiyon yüksekliği ve anemi hastalığını önleme sonucu doğmaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Silva ve Malcata, 2005). Kazein kaynaklı fosfopeptitler bazı elementler ile organofosfat tuzu oluşturarak raşitizmin iyileşmesi için kullanılabilir (Meisel ve Schlimme, 1990). Bunun yanı sıra bağırsakta bulunan belirli peptitler ve çözeltideki kalsiyum ile fosfor gibi minerallerle birleşerek yeni bileşikler oluşturmaktadır. Bu peptitler, negatif yük taşıdıkları için, enzimlerin etkisine karşı daha dayanıklı hale gelmekte ve çözünmeyen mineral bileşiklerinin oluşumunu engellemektedir. Süt kazeinlerinin ayrıca kalsiyum ve fosfor iyonlarını bağlayarak biyoyararlılığını arttırdığı da bilinmektedir (Bhandari ve diğerleri, 2020; Omoni ve Aluko, 2006). Peynir altı suyunda bulunan zincirli aminoasitlerce zengin olan glikomakropeptidin farklı karaciğer hastalıklarında karbon desteği olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Abd El-Salam

ve diğerleri, 1996). Glikomakropeptit ve α -laktalbümin ilaveli besinlerin yavru Rhesus maymunlarında çinko emilimini arttırdığını saptamıştır (Kelleher ve diğerleri, 2003). Ayrıca, glikomakropeptidin prebiyotik olarak da bağırsak sağlığına katkı sağladığı ve probiyotik bifidobakteri türlerinin gelişimine katkı sağladığı görülmektedir (Kasal ve diğerleri, 1992). Glikomakropeptit, aminoasit bakımından zengin olmakla birlikte, aromatik aminoasitler (fenilalanin, triptofan ve tirozin) açısından düşük içeriğe sahiptir. Bu nedenle fenilalanin içermemesi nedeniyle fenilketonüri hastaları için güvenli bir protein kaynağı olarak kabul edilmektedir (Keri Marshall, 2004).

Biyoaktif peptitlerin mide ülserine karşı olan etkisi, çoğunlukla antioksidan özellik gösteren peptitlerin dolaylı yollarla ortaya çıkmaktadır. Alkol tüketimi, özellikle karaciğer ve mide gibi organlarda biyokimyasal değişimlere ve patolojik bozukluklara yol açmaktadır. Bu etkilerden biri de mide dokusunda meydana gelen hasarlardır. Oksijen türevli serbest radikaller, alkolün neden olduğu zararları artırmaktadır. α -laktalbümin kaynağından elde edilen antioksidan peptitler, serbest radikallerin ve yağ oksidasyonunun önüne geçerek hücrelerin ve dokuların hasar görmesini engeller. Bu etkileşim, biyoaktif peptitlerin mide ülseri üzerindeki faydalı etkilerini göstermektedir (Biswas ve diğerleri, 2003).

2.3.2. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Dünya nüfusunun yaşlanmasıyla birlikte kalp damar rahatsızlıkları genel olarak önde gelen halk sorunu haline gelmektedir. Kardiyovasküler sistem hastalıkları dünya çapında insan ölümlerinin önde gelen sebepleri arasında yer almaya devam etmektedir. Bu ölümlerin oranları 2000’li yıllarda dörtte bir oranında artarak 2019 yılında 17,9 milyona ulaşmıştır ve bu sayının 2030 yılına kadar 22 milyona ulaşması beklenmektedir (Tu ve diğerleri, 2021). Yetersiz beslenme, sigara ve alkol tüketimi, hareketsiz yaşam ve diyabet gibi bazı metabolik rahatsızlıklar kardiyovasküler sistem için başlıca risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Bu risklerin ötesinde iyileştirici ve önleyici etki olarak sağlıklı beslenme önerilmektedir. Yapılan araştırmalar ve bulgular sonucunda süt proteininin özellikle %80’ini proteinini oluşturan kazein proteini takviyesinin kan basıncını düşürmede etkili bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir (Fekete ve diğerleri, 2016; He ve diğerleri, 2011; Tu ve diğerleri, 2018). Kazeinin, antioksidan, antihipertansif gibi birçok biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Oksidatif stres ve kronik inflamasyon kardiyovasküler sistem hastalıklarının gelişim sürecinde kritik rol almaktadır. Bu nedenle kazeinin kardiyovasküler sisteme etkisinin iyi bilinmesi önemlidir. Hidrolizatların C-

terminalinden iki amino asidi çıkararak anjiyotensin I'i vazokonstriktör anjiyotensin II'ye dönüştüren anjiyotensin I dönüştürücü enzimin aktivitesini bloke ederek kan basıncını düşürdüğü kanıtlanmıştır (Tu ve diğerleri, 2020; Zhou ve diğerleri, 2022).

Biyoaktif peptitlerin, kardiyovasküler sistem üzerinde de pozitif etkileri olduğu açıkça görülmektedir. Biyoaktif peptitlerin antihipertansif, antitrombotik ve antioksidatif etkileri kardiyovasküler sistem üzerinde pozitif anlamda katkılar sağlamaktadır (Beermann ve Hartung, 2012). Ayrıca bazı proteinlerin parçalanmasıyla ortaya çıkan peptitlerin antitrombotik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Antitrombotik özelliklere sahip biyoaktif peptitler, kanda pıhtı oluşumunu engelleyerek veya azaltarak etkili olur. Kazeinomakropeptitler, rennin enziminin süt proteinleri ile etkileşimi sonucu pıhtılaşan k-kazein'den üretilir (Fiat ve diğerleri, 1993). Bu kazeinomakropeptitler, fibrinojenin trombosit yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerine bağlanmasını inhibe ederek trombosit agregasyonunu engellemektedir (Özdemir ve diğerleri, 2021; Silva ve Malcata, 2005).

Fibrinojen, karaciğerde sentezlenmektedir ve kanın pıhtılaşma sürecinde kritik bir işlevi olan bir proteindir. Bu protein trombin enzimi ve kalsiyum varlığında fibrine dönüşerek pıhtılaşmayı başlatmaktadır (Denizli ve Yavuz, 2011). Fibrinojenin fibrin oluşturma yeteneği, özellikle gama zinciri tarafından sağlanır. Ayrıca, fibrinojenin gama zinciri ile sütteki κ -kazein peptit zinciri arasında benzer yapılar olduğu tespit edilmiştir. κ -Kazeinin tripsinle hidrolizi sonucu oluşan ve kasoplatelin olarak bilinen peptidin, fibrinojenin trombosit yüzeyindeki glikoprotein reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek antitrombotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Silva ve Malcata, 2005; Smacchi ve Gobbetti, 2000).

Öte yandan karaciğerde üretilen anjiotensinojen, böbreklerde salgılanan renin enzimi ile etkileşerek anjiyotensin I'e dönüşür. Anjiyotensin I, daha sonra anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığıyla anjiyotensin II'ye çevrilir. Bu değişim, kan damarlarında küçülme ve dolayısıyla kan basıncında yükselmeye yol açmaktadır (Bhat ve diğerleri, 2017; Bulca ve Güvenç, 2020; Gobbetti ve diğerleri, 2004). İnsan ve hayvanların kazein hidrolizatlarını oral yolla alması sonucu hidrolizatların, makul bir dozda tüketimi nispeten güvenli bulunmuştur. Kazein hidrolizatın antihipertansif etkisi göz önüne alındığında, kazein hidrolizatı sentetik ACE inhibitörleri ile sinerjistik bir etki oluşturabilir ve hipertansif hastalarda sentetik ACE inhibitörü

uygulama miktarını azaltabilir (Dent ve diğerleri, 2007; Doorten ve diğerleri, 2009; Duffuler ve diğerleri, 2022; Sano ve diğerleri, 2005).

Kazeinin hidroliziyle kazokininler, α -laktoalbumin ve β -laktoglobulinin hidroliziyle ise laktokininler meydana gelir. Bu peptitler, kan basıncının yüksekliğini kontrol altında tutarak ACE inhibe edici özellik göstermektedir (Ebringer ve diğerleri, 2008; Nielsen ve diğerleri, 2009; Pihlanto-Leppälä ve diğerleri, 1998; Şanlıdere ve Öner, 2006). α_{s1} -kazeinden elde edilen hidrolizatların, yüksek oranda ACE inhibe edici aktiviteleri saptanmıştır (Silva ve Malcata, 2005). Japonların yemek kültüründe bulunan misoya kazein eklenerek elde edilen ürünlerin farelerde antihipertansif etki gösterdiği belirtilmiştir (Inoue ve diğerleri, 2009). Başka bir çalışmada, farelerin ACE inhibitörlerinin yüksek olduğu gıdalarla beslenmesinin hipertansiyonu azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, fermente süt içeceklerinin düzenli tüketiminin hipertansiyonu olan bireylerde kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Pihlanto ve diğerleri, 2010; Seppo ve diğerleri, 2003; Yoshikawa ve diğerleri, 2000).

2.3.3. Bağışıklık Sistemi ve Hastalıklar

Bağışıklık sistemini pozitif yönde etkileyen biyoaktif peptitler arasında α -kazein, β -kazein ve α -laktalbuminden elde edilen immünopeptitler bulunmaktadır (Beermann ve Hartung, 2013; Haque ve diğerleri, 2008). İmmünopeptitlerin antikör üretimi sonucunda fagositoz, makrofajların sitotoksik işlevleri, lenfosit çoğalması, T-lenfositlerinin kontrolü ve hücre ölümünü tetikleyen aktiviteler gibi bağışıklık sistemini etkileyen düzenleyici işlevler gösterebilmektedir. Etkilerin arttırıcı veya engelleyici olması, yoğunluğa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin, bazı kazomorfınlerin düşük konsantrasyonlarda lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda bu proliferasyonu teşvik ettiği bildirilmiştir (Gill ve diğerleri, 2000; Tirelli ve diğerleri, 2000). Kazein ve laktoferrinin parçalanmasıyla elde edilen peptitler, antitümör ve hücre ölümü etkileri göstermektedir. Bu özellikleri nedeniyle antikarsinojen etki sergiledikleri söylenebilir (Meisel, 2005; Yang ve diğerleri, 2004). İnsan ve inek sütünde bulunan α -laktalbumin proteininin antitümör etkisinin olduğu bulunmuştur. Bu proteinin, gırtlak kanseri (Knyazeva ve diğerleri, 2008) ve akciğer kanser hücrelerini yok edici etkileri saptanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2009). Kazomorfınlerin meme kanserine karşı etkiler sergilediği tespit edilmiştir.

2.3.4. Antihipertansif Peptitler

Modern yaşam tarzındaki değişiklikler, hipertansiyon tedavisinde kan basıncını düşüren fonksiyonel gıdalara olan ihtiyacı arttırmıştır. Hipertansiyon, kalp ve böbrek hastalıkları, arterioskleroz ve felç gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Protein hidrolizatlarından elde edilen antihipertansif peptitler, özellikle ACE inhibitörleri olarak bilinir ve en çok araştırılan peptitlerdir. Süt kaynaklı antihipertansif peptitler, ACE inhibitörleri olarak bilinen kazokinin ve laktokininleri içerir. Bu peptitler, vücuttaki kan basıncı ve sıvı dengesini düzenleyen ekzopeptidazlar olarak çalışır ve substratları uçtaki karbon atomundan ayırarak dipeptitler oluştururlar. Bu sayede, süttten elde edilen biyoaktif peptitler, damar sertliği ve tıkanıklığı gibi kalp rahatsızlıklarının önlenmesinde önemli bir rol üstlenir (Yalçın ve Rakıcıoğlu, 2020). İlk yaklaşım olarak, *L. helveticus* ve *S. cerevisiae* kombinasyonu kullanılarak antihipertansif aktiviteye sahip fermente süt üretilmiş ve bu süreçte iki ACE inhibitörü tripeptit olan VPP ve IPP elde edilmiştir. Bu peptitler hem hayvanlarda hem de insanlarda yüksek antihipertansif etki göstermiştir (del Mar Contreras ve diğerleri, 2009). Enterococcus türleriyle eşde edilen fermente süt ürünlerinin de antihipertansif aktivite özellikleri saptanmıştır (Miguel ve diğerleri, 2005; Muguerza ve diğerleri, 2006). β -kazeinden elde edilen f133-138 peptit, ACE inhibitörü ve antihipertansif etkilerinden sorumlu peptitlerden biri olarak tanımlanmıştır. Bu peptitler, üretilen fermente süütün antihipertansif aktivitelerinin temelini oluşturmaktadır (Quirós ve diğerleri, 2007). İkinci yaklaşım, süütün enzimatik hidrolizine dayanmaktadır. Bu yöntemle, gıda sınıfı proteinlerinden biri veya birden fazla kombinasyonu kullanılarak, antihipertansif özelliklere sahip çeşitli peptitler üretmek amacıyla enzimler kullanılır. Bu strateji, özellikle kazeinatlar, tekli kazein fraksiyonları ve peynir altı suyu gibi kaynaklardan elde edilen sindirimlerde sıkça tercih edilmektedir (FitzGerald ve diğerleri, 2004; Korhonen ve Marnila, 2006). Özellikle tripeptitler veya daha uzun peptitler, ACE'yi inhibe ederek kan basıncının kontrolüne yardımcı olabilirler. Deve sütü kazein fraksiyonunun yapısında, diğer türlerden elde edilen sütlerdeki kazein fraksiyonlarına kıyasla daha fazla miktarda prolin bulunduğu ve bunun da deve sütünden elde edilen hidrolizatların daha iyi ACE inhibitör ve antioksidan aktivite göstermesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Moslehishad ve diğerleri, 2013). Farelerde yapılan bir araştırmada, süt kazeininden elde edilen valil prolin ve izolösil prolin prolin tripeptitlerinin, damarları genişleterek kan basıncını azalttığı ve insan umbilikal damar hücrelerinde nitrik oksit üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir (Hirota ve diğerleri, 2011). Yapılan Farklı bir araştırmada ise kazeinden elde edilen hidrolizat fraksiyonlarının ACE

inhibisyon aktivitesi gösterdikleri belirtilmiştir (Miguel ve diğerleri, 2009). Yapılan çalışmalara göre orta derecede olgunlaştırılmış peynirlerin en yüksek ACE-inhibitör aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Sieber ve diğerleri, 2010). α_{s1} -kazeinden açığa çıkan peptitlerin ise özellikle yüksek ACE inhibisyon aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir (Silva ve Malcata, 2005).

2.3.5. Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptitler, çeşitli bakteri, virüs ve mantarlardan koruyarak antimikrobiyal etki göstermektedirler. Antimikrobiyal aktivite ürünün raf ömrünü etkilemesi sebebiyle paketli gıdalar için istenilen bir özelliğe sahiptir (Haney ve Hancock, 2013). Son yıllarda, gıda teknolojisinde antimikrobiyal peptitlerin koruyucu olarak kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bugün, gıdalarda genellikle tuz, nitrit, nitrat, benzoik asit ve türevleri, baharatlar ve şeker gibi maddeler antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Ancak bu maddelerin bazı olumsuz yönleri nedeniyle, biyoaktif peptitler alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Süt içerisinde doğal olarak bulunan kazein, immünoglobülin, laktoperoksidaz, laktoferrin ve lizozim gibi proteinlerin miktarı, sütün temin edildiği hayvansal türe bağlı olarak değişir. Bu proteinlerin parçalanmasıyla oluşan peptitler, antimikrobiyal özellikler gösterebilir (Ebringer ve diğerleri, 2008). Antimikrobiyal peptitler, üç farklı gruba ayrılır: kısa (20-46 amino asit), bazik (Lisin ve Arjinin açısından zengin) ve amfipatik. Ayrıca, Lösin, İzölösin, Valin, Fenilalanin ve Triptofan gibi hidrofobik kalıntılar bu peptitlerde yaygın olarak bulunur (Haney ve Hancock, 2013). Çok hücreli organizmalar, patojen mikroorganizmalara karşı savunma amacıyla antimikrobiyal peptitler üretir. Bu peptitler, mikropların hücre zarlarını bozabilir ve hücre bölünmesi gibi biyolojik süreçleri etkileyebilir (Yadavalli ve diğerleri, 2016). Biyoaktif peptitler bakterileri hayatta kalmaları ve büyümeleri için gerekli olan besin maddelerinden yoksun bırakarak antimikrobiyal etki gösterirler. Yapılan incelemeler sonucunda kazein türevi peptitlerin *S. aureus* hariç tüm bakterilere karşı etkili olabileceğini göstermiştir (Théolier ve diğerleri, 2014). Sütün antimikrobiyal etkisi, kapsamlı araştırmalarla doğrulanmıştır. Gastrointestinal sistemde, laktoferrin hidrolize olarak laktoferrine dönüşerek diğer biyoaktif peptitlerin sentezine önemli bir katkı sağlamaktadır. Ayrıca, laktoferrin tek başına da antimikrobiyal özellik göstermektedir (Kamali Alamdari ve Ehsani, 2017).

α_{s1} -kazein ve α_{s2} -kazein kaynaklı biyoaktif peptitlerin *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Staphylococcus* gibi bakteri türlerine karşı (Korhonen ve Pihlanto, 2006), aynı

zamanda β -kazein türevli biyoaktif peptitlerin de *Klebsiella pneumoniae* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bilinmektedir (Silva ve Malcata, 2005). Farklı bir çalışmada ise α -kazein proteininin isracidin peptit fraksiyonunda fare ve koyunda *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinin bulunduğu ve buna ek olarak mastitiste karşı da koruduğu saptanmıştır (Tome ve Ledoux, 1998). Süt proteinlerinden hidrolize edilen antimikrobiyal peptitler farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterebilmektedir (Corrêa ve diğerleri, 2011). Sütün peynir gibi son ürüne dönüşmesi sırasında yapılan fermentasyon da biyoaktif peptitlerin artmasını sağlamaktadır. 90 gün olgunlaşması beklenen Tulum peynirinde elde edilen biyoaktif peptitlerin *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 türlerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bakterilerin hücre zarlarındaki farklı yapılar nedeniyle, peynirden elde edilen peptit ekstraktlarının antibakteriyel etkisi, bakteriyel türlere göre farklılık gösterebilir (Öztürk ve Akın, 2021). Çalışmalarında koyun sütünden elde edilen biyoaktif peptitlerin *Bacillus cereus* ve *Corynebacterium fimi* türlerine karşı antimikrobiyal potansiyellerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda hidrolizatların bu iki tür mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ve inhibisyon alanlarının 9,3-11,5 mm aralığında değiştiği belirlenmiştir (Corrêa ve diğerleri, 2011). İtalyan peynirleri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada peynirden elde edilen peptitlerin *Lactobacillus sakei* A15, *Listeria innocua* DSM 20649, *Bacillus megaterium* F6 ve *Escherichia coli* K12 suşlarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Rizzello ve diğerleri, 2005).

2.3.6. Antioksidan Peptitler

α_s -kazeinden türetilen peptitler serbest radikal süpürme kapasitesine sahiptir ve enzimatik ve enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Rival ve diğerleri, 2001; Suetsuna ve diğerleri, 2000). Proteolitik enzimler, enzimatik hidroliz yoluyla kazeinlerden, soya fasulyesinden ve jelatinden antioksidan peptitleri serbest bırakabilirler (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Antioksidan peptitler, gıda ürünlerinin oksidatif bozulmalarını engelleyerek raf ömürlerini uzatır. Bu peptitler genellikle starter ve starter olmayan laktik asit bakterilerinin etkisiyle kazeinlerden türetilmektedir. Yapılan araştırmalar, laktik asit bakterilerinin proteolitik enzimleri sayesinde özellikle α_s -kazein fraksiyonundan elde edilen hidrolizatların antioksidan aktivite sergilediğini ortaya koymuştur (Ay ve Şanlı, 2018). Düşük sıcaklıkta işlenmiş peynir altı suyu proteini yüksek seviyelerde spesifik dipeptitler (glutamilsistein) içermektedir (Bounous ve Gold, 1991). Bu dipeptitler, hücresel koruma ve onarım süreçleri için önemli bir antioksidan olan glutatyonun sentezini destekleyebilmektedir. Yoğurt, kefir ve peynir gibi

fermente süt ürünlerinin süperoksit, hidroksil ve peroksit radikalleri ile diğer reaktif oksijen türlerini nötralize etme yeteneğine sahip olduğu ve bu ürünlerin antioksidan özellikler taşıdığı araştırmalarla belirtilmiştir (Chen ve diğerleri, 2003; Hilario ve diğerleri, 2010; Songisepp ve diğerleri, 2004). Yapılan çalışmalarda, kazein proteinlerinin antioksidan özellikler gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, süt proteinlerinin başlıca β -laktoglobülin ve kazein proteinlerinin, sütün toplam antioksidan kapasitesinin büyük bir kısmından sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Hammershøj ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2007; Sakkas ve diğerleri, 2014).

Süt proteinleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, α -kazein ve β -laktoglobülin proteinlerinin hücre yaşlanmasını engelleyerek ve miyoblastların farklılaşmasını ve olgunlaşmasını teşvik ederek oksidatif stresin yol açtığı yaşlanmayı azaltıcı özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Kim ve diğerleri, 2019). Ayrıca, β -kazein fraksiyonu, içerdiği prolin kalıntıları nedeniyle yüksek antioksidan aktivite gösterir. Çekiç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yağsız süt, kazein ve farklı protein-süt karışımlarının toplam antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmış ve bu özelliklerin süt proteindeki varlıklarını ortaya çıkarmıştır (Çekiç ve diğerleri, 2015).

Kazein proteininden üretilen fosfopeptitler bağırsakda çözünmeyen kalsiyum fosfat birikimesini engelleyerek kalsiyum emilimini artırma özelliğine sahiptir. Bu biyoaktif peptitler, α_{s1} -, α_{s2} - ve β -kazeinlerinin sindirimi sırasında oluşur. Fosfopeptitlerin yapısında bulunan yüksek negatif yükler, bu peptitlerin daha az proteolize uğramasını sağlar. Ayrıca, fosfat gruplarındaki negatif yükler, minerallerin bağlanmasını kolaylaştırarak Kalsiyum, Magnezyum, Demir gibi makro elementler ile Çinko, Baryum, Krom, Nikel ve Kobalt gibi mikro elementleri bağlama kapasitesine sahiptirler. Fosfopeptitlerin mineral bağlama yetenekleri, belirli sağlık sorunlarının önlenmesinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Ay ve Şanlı, 2018; Korhonen ve Pihlanto, 2006; Silva ve Malcata, 2005).

2.3.7. Antidiyabetik ve Antiobezite Peptitleri

Dünya çapında, obezite sorunu, gelişmiş ve gelişmekte olan bölgelerde giderek daha yaygın hale gelmektedir. Yağ dokularındaki aşırı trigliserit birikimi, enerji alımı ile harcaması arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve bu durum, aşırı kilo ve obeziteye yol açmaktadır. Obezite, vücut kitle indeksi (body mass index, BMI) 30 kg/m^2 'nin üzerinde olan bireylerde tanı konur ($\text{BMI} = \text{kilo (kg)} / \text{boy}^2 (\text{m}^2)$). Obezite, aşırı vücut yağı birikimine yol açar ve bu durum, diyabet riskini artırarak küresel diyabet yaygınlığını da beraberinde getirir. Obezite ve diyabet

gibi metabolik bozukluklar, karmaşık patofizyolojileri nedeniyle tedavi edilmesi zor hastalıklardır ve mevcut tedavi yöntemleri bazen istenmeyen yan etkilere yol açabilir. Obezite, her yıl milyonlarca ölüme yol açtığı için erken ölümün önde gelen risk faktörlerinden biridir. Literatürde, kilo kaybını destekleyen gıda kaynaklı anti-obezite biyoaktif bileşenlerinin fitomedikal ilaçlardan gıda proteinleri ve biyoaktif peptitlere kadar geniş bir yelpazede yer aldığı bildirilmiştir (Ashaolu ve diğerleri, 2024; Li ve diğerleri, 2022; Wharton ve diğerleri, 2020). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada fermente süt ürünlerinden elde edilen hidrolizatların antidiyabetik ve lipaz inhibisyon aktivitelerinin tespit edildiği belirtilmiştir (Azadikhah ve diğerleri, 2024). Laktik asit bakterileri ile fermente edilen süt ürünlerinin hidrolizatlarının lipaz inhibisyon aktivitesi saptanmıştır (Gil-Rodríguez ve Beresford, 2019). β -laktoglobulin süt proteininden elde edilen triptik hidrolizatlar, hipokolesterolemik etkiler gösteren bir peptit içerdiği belirlenmiştir. Bu peptit, Caco-2 hücrelerinde (kolon adenokarsinom hücreleri) kolesterol emilimini engellediği rapor edilmiştir (Nagaoka ve diğerleri, 2001).

Diyabet, insülin etkisi veya insülin salgısındaki problemler sonucu ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize edilen karmaşık bir metabolik bozukluk grubudur. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre, 2021 yılında dünya genelinde yaklaşık 537 milyon yetişkinin diyabetle yaşadığı tahmin edilmekte olup, bu sayının 2045 yılına kadar 629 milyonu aşacağı öngörülmektedir. Tip 2 diyabet, diyabetli bireylerin %90'ını oluşturmaktadır. Diyabet dolayısıyla ölüm oranları çok yüksektir ve bu nedenden dolayı diyabetin iyileştirici ve baskılayıcı etkisinin olacağı bir takım arayışlar içine girilmiştir (Wang ve diğerleri, 2024). Biguanidler, tiazolidindionlar ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibitörleri gibi çeşitli hipoglisemik ajanlar geliştirilmişken, şişkinlik, rahatsızlık ve bazen ishal gibi yan etkiler nedeniyle, nispeten düşük yan etkilere sahip doğal kaynaklardan elde edilen antidiyabetik adaylar daha fazla ilgi görmüştür. Bu nedenle kazein hidrolizatları, hipoglisemik etkileri nedeniyle anti-diyabetik ajanlar olarak ilgi görmüş ve bu etkiler, özellikle insülin üretimini artırmaya ve insülin direncini azaltmaya yönelik insüline bağımlı mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, kazein ve kazein hidrolizatlarının insülin salınımını uyardığı ve hepatik insülin duyarlılığını iyileştirdiği gösterilmiştir (Drummond ve diğerleri, 2018; Kett ve diğerleri, 2012; Lillefosse ve diğerleri, 2013; Nongonierma ve FitzGerald, 2013; Nongonierma ve diğerleri, 2017). Kazeinden elde edilen Valin-Prolin-Lösin-Glisin peptidinin farelerde oral yolla alınmasının kandaki glikoz seviyelerinin azalmasına sebep olmuştur (Wang ve diğerleri, 2024). Farklı türlerde enzim

kullanılarak elde edilen süt proteinlerinde DPP-IV inhibe edici peptitler tespit edilmiştir (Mazorra-Manzano ve diğerleri, 2018).



3. MATERİYAL VE METOT

Tez çalışması temel olarak 5 aşamada gerçekleştirilmiştir. Tezin ilk aşamasında; asit kazein elde edilmiş ve enzimatik reaksiyonların etkin şekilde gerçekleştirilebilmesi için homojen bir dispersiyona dönüştürülmüştür.

- İkinci aşamada, kazein hidrolizatı üretiminde yüksek biyoaktivite sağlayan endopeptidaza karar verilmiştir.
- Üçüncü aşamada, kazein hidrolizatı üretiminde ekzopeptidaz kullanımının etkisi belirlenmiştir.
- Dördüncü aşamada, yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı üretim optimizasyonu ve işlem koşullarının biyoaktivite üzerine etkileri incelenmiştir.
- Son aşamada ise, üretilmiş olan yüksek biyoaktivite gösteren kazein hidrolizatının gıda bileşeni olarak ayıranda kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur.

3.1. Biyoaktif Peptit Üretiminde Kullanılan Hidroliz Enzimleri

Tez çalışmasında kazeinden biyoaktif peptit üretiminde hidroliz amacıyla 3 farklı endopeptidaz enziminin denenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, endopeptidaz enzimleri olarak Neutrase® 0.8 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka), Alcalase® 2.4 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) ve rTrypsin® 800 USP/mg (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) enzimleri tedarik edilmiştir. Buna ek olarak, endopeptidaz enzim faaliyeti ile elde edilen kazein hidrolizatının biyoaktif özelliklerini geliştirme ve endopeptidaz aktivitesini destekleme potansiyelini ortaya koymak üzere, endopeptidaz enzimleri ile birlikte ekzopeptidaz enzimlerinin çalışma etkinliği incelenmiştir. Bu doğrultuda 2 farklı ekzopeptidaz kullanılmıştır: Flavourzyme® 1000 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) aminopeptidaz grubu bir enzimken (1100 LAPU/g), Protana™ Prime (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) hem aminopeptidaz (970 LAPU/g), hem de karboksiptidaz (890 CPDU-A/g) etkinliği gösteren bir enzimdir.

Çalışılması belirlenen enzimlerden Neutrase® enzimi, optimum çalışma pH'sı 7 ve sıcaklığı 40-50 °C aralığında olan, *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden elde edilen bir metallo/endopeptidaz enzimidir. Alcalase® 2.4 L, pH 7-9, sıcaklığı 30-65 °C aralıklarında

Bacillus licheniformis kaynağından, rTrypsin® ise pH 7-8 aralığında, optimum çalışma sıcaklığı 35-45 °C ve mikrobiyal fermentasyon ile elde edilen bir serin/endopeptidazlardır.

Çalışmaya karar verilen ekzopeptidaz enzimlerden Flavourzyme® enzimi, optimum çalışma pH'sı 6,5-7 ve sıcaklığı 45-55 °C aralığında olan, *Aspergillus oryzae* mikroorganizmasından elde edilen bir ekzopeptidazdır. Protana™ Prime enzimi, optimum çalışma pH'sı 6-7 ve sıcaklığı 20-60 °C aralığında olan bir ekzopeptidazdır.

3.2. Üretimler

Tez çalışmasında kullanılacak hammadde olan kazein, yağsız süttten asitleştirme ile elde edilmiş ve enzimatik reaksiyonların homojen gerçekleştirilebilmesi için homojen bir dispersiyona dönüştürülmüştür. Sonrasında, hazırlanan bu hammaddenin hidrolizi ile kazein hidrolizati elde edilmiş ve bu süreçte elde edilen hidrolizatın biyoaktivitesindeki değişimler incelenmiştir.

3.2.1. Asit Kazein Eldesi

Asit kazein elde etmek için kullanılan süt, Adana yöresindeki Ali Baba Çiftliği Süt Firmasından yağsız çiğ inek sütü olarak temin edilmiştir. Sütler, Temmuz- Ağustos 2020 tarihleri aralığında Holstein ve Jersey inek sütlerinin karışımları olarak 2 ile 7 gün aralıklarla 7 kez alınmıştır. Asit kazein üretiminde Bu çalışmadaki üretim akışı Şekil 3.1'de verilen yönteme göre uygulanmış ve ön denemeler ile kesinleştirilmiştir (Sarode ve diğerleri, 2016). Bu yönteme göre, kullanılan sütün yağı firma tarafından santrifüj ayırıcılarda alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan asit kazein üretim prosedürü şu şekildedir:

Tedarik edilen yağsız sütler ısıtmalı-sirkülasyonlu su banyosunda (IKA ICC Basic Eco 8, Staufen, Almanya) hızla 75 °C'ye ısıtılmış, 15 saniye bekletilerek pastörize edilmiştir. Pastörizasyon sonrası sütler, hızlı bir şekilde 40 °C'ye soğutulmuş ve bu sıcaklıkta 40 dakika bekletilmiştir. Daha sonra pıhtılaşma sıcaklığı olarak belirlenen 35 °C'ye sütler soğutulmuş ve çok hafif bir karıştırma ile süte yavaş bir şekilde 0.1 M asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Süt pH'sı 4.6'ya gelene kadar asitleştirme işlemi sürdürülmüş ve pıhtılaşma sağlanmıştır. Daha sonrasında herhangi bir süzme işlemi gerçekleştirilmeden, karışım 50 °C'ye ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında peyniraltı suyu süzölmüş ve pıhtıya 50 °C'de saf su ilave edilerek, ısıtmalı manyetik karıştırıcıda (IKA C-MAG HS 10, Staufen, Almanya) orta düzey bir karıştırma işlemi ile 15 dakika yıkanmıştır. Bu yıkama sonrası yıkama suyu

uzaklaştırılmış ve aynı yıkama işlemi önce 40 °C’de, sonra 35 °C’de su ile tekrarlanmıştır. Her yıkama sonrasında (toplamda 3 kez), peynir süzme bezi kullanılarak kazein pıhtısından yıkama suyu uzaklaştırılmıştır. Son yıkama işlemi sonrasında pıhtı, süzme bezinde asılmış ve 20 dakika askıda bekletilmiştir. Sonrasında bezdeki pıhtı elle sıkıştırılarak kalan suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Uygulanan prosedür Şekil 3.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Asit kazein üretimi

Çalışmada hammaddeden kaynaklı farklılıkları minimuma düşürmek amacıyla kazein üretimleri toplu şekilde gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar koşullarında yoğun bir çalışma ile günde ortalama 10 litre kadar süt işlenebileceğine karar verilip, Ali Baba Çiftliği’nden 10-20 litre aralığında değişen miktarlarda sütlerin asit kazein üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada gerekecek asit kazein miktarının en az 7 kg olacağı tahmin edilmiş ve bu doğrultuda 2 ile 7 gün aralıklarla toplam 7 kez çiğ süt tedariki gerçekleştirilmiş ve toplam 84,7 kg süttten 7,3 kg asit kazein üretilmiştir. Yaklaşık 1 ay süren üretimler sonucunda elde edilen tüm asit kazein paçal yapılarak karıştırılmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere 100'er gramlık numune kaplarına porsiyonlanarak dondurulmuştur. Asit kazein pıhtıları üretim ve analizlerde kullanılabına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Üretilen asit kazeinin kuru maddesi $34,2 \pm 0,2$, protein içeriği ise $30,5 \pm 1,0$ olarak analiz edilmiştir.

3.2.2. Asit Kazeinin Homojen Bir Dispersiyona Dönüştürülmesi

Üretilen asit kazeininin etkin şekilde hidroliz edilebilmesi için akışkan, homojen ve kararlı bir dispersiyona dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda, sodyum fosfat temelli bir tamponla asit kazeinin pH'sının nötr pH'ya yaklaştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Hidroliz sürecinin 72 saate kadar süreceği öngörülerek, 45 °C'de 72 saat boyunca, çalkalamalı inkübatörde, homojen dispersiyon yapısını koruyacak, çökmeyecek ve kabın duvarlarına yapışmayacak bir kazein konsantrasyonunda dispersiyon hazırlanması planlanmıştır. Bu koşullarda yapılan ön denemelerde 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 ve 1:10 oranlarında asit kazein:fosfat tampon çözeltisi (pH 8'e ayarlı, NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 içeren 0,1 M tuzsuz fosfat tamponu) ultra-Turrax (IKA T-18, Staufen, Almanya) kullanılarak karıştırılmış ve çalkalamalı inkübatörde (IKA KS 3000 İ control, Staufen, Almanya) 45 °C'de 72 saat boyunca 200 rpm karıştırma hızında bekletilmiştir. Ön denemeler sonucunda, 1:1 ve 1:2 oranlarında kararlı dispersiyon elde edilememiş, ancak 1:3 oranından itibaren homojen ve kararlı dispersiyonlar elde edilebilmiştir. Yüksek ve etkili bir kazein konsantrasyonunda çalışma hedefiyle 1:3 (kazein:fosfat tamponu, w/v) oranının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu şekilde üretilen çözeltilerdeki kuru madde oranının yaklaşık %8,6, kazein oranının ise yaklaşık %7,5 olduğu belirlenmiştir. Analizlerde hem iyi bir dispersiyon oluşturmak hem pastörizasyon sağlamak ve ayrıca daha büyük çaplı hacimlerde çalışabilmek için bu işlem Thermomix cihazında gerçekleştirilmek üzere modifiye edilmiştir. Bu modifikasyonun gerçekleştirilmesinde literatürde belirtilen eritme işlemi esas alınmıştır (Çam ve diğerleri, 2018). Ön deneme üretimlerinde karışımın aşırı köpürmesi sorunu ile karşılaşmış ve sonuçta; asit kazeinin homojen ve kararlı bir dispersiyona dönüştürülmesinde aşağıda tarif edilen prosedür uygulanmıştır:

Asit kazein:fosfat tamponu oranı 1:3 olacak şekilde asit kazein tartılmış ve Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Almanya) cihazına konulmuştur. Thermomix cihazında asit kazein 7000 rpm'de 60 saniye karıştırılarak parçalanmıştır. Sonrasında, kazein bazında %2 trisodyum sitrat, %1 trisodyum fosfat tuzları ile %0,2 potasyum sorbat içeren ve pH'sı 8'e ayarlanan fosfat tamponu 80 °C'ye ısıtılıp karışımın üzerine ilave edilmiştir. Tüm karışımın sıcaklığı 80 °C'ye ulaşana kadar 4000 rpm'de karıştırılmış ve sıcaklık 80 °C'ye ulaştıktan sonra aynı hızda 15 dakika daha karıştırma işlemi sürdürülmüştür. Bu şekilde hazırlanmış ve pastörizasyonu gerçekleştirilmiş olan kazein dispersiyonu, hızla soğutulmuş ve köpüğü soğukta giderildikten sonra numune kaplarına porsiyonlanmış ve dondurularak -20 °C'de hidrolizat üretimleri için saklanmıştır.

3.2.3. Kazein Hidrolizatı Üretimleri

Üretilen ve homojen bir dispersiyona dönüştürülen asit kazein, hidroliz enzimleri ile muamele edilerek yüksek biyoaktif özelliklere sahip, biyoaktif peptitçe zengin kazein hidrolizatı üretiminde kullanılmıştır. Kazein hidrolizatı üretiminde öncelikle en yüksek biyoaktivite sağlayan uygun endopeptidazın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, çalışılacak endopeptidaz enzimleri olarak Neutrase® 0.8 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka), Alcalase® 2.4 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) ve rTrypsin® 800 USP/mg (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) enzimleri seçilmiş ve bu enzimlerin optimum çalışma koşulları da dikkate alınarak ön denemelerle çalışılacak işlem koşulları belirlenmiştir. Daha sonra, bu ön denemelerle belirlenen işlem koşullarında kazein hidrolizat üretimleri ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Endopeptidaz kullanılarak elde edilen hidrolizat üretimleri aşağıdaki yöntemle sağlanmıştır.

Hazırlanmış olan asit kazein dispersiyonları 45 °C'ye getirilip, kazein bazında belirlenen konsantrasyonlarda enzim ilavesi gerçekleştirilmiştir (Neutrase® için %1.25, Alcalase® için %1.25, rTrypsin® için %2.50). Enzim ilavesi öncesinde örneklere 10 dakika kesintisiz ultrases (T103 problu, Sonoplus, Bandelin, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Ultrases aşamasında sıcaklık 55°C'yi geçmeyecek şekilde çalışılmış ve probun 1/3'ü örneklere gelecek şekilde üretimler sağlanmıştır. Karar verilen üretim şeması aşağıda verilmiştir.

Örneklere 10 dakika ultrases ön işlemi uygulanmıştır. Sonrasında yukarıda belirttiğimiz miktarlardaki konsantrasyonlarda enzim eklenmiştir. Enzim ilavesi sonrası örnekler çalkalamalı inkübatörde 12 saat boyunca, 45 °C'de, 200 rpm'de inkübe edilmiş ve çeşitli

aralıklarla (0, 2, 4, 8 ve 12 saat) hidrolizatlardan örnek alınmıştır. Enzim inaktivasyonu için örnekler 90 °C’de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir.

Bu aşamanın sonucunda en uygun endopeptidaz olarak Neutrase® 0.8 L belirlenmiş ve bu enzimle yapılan kazein hidrolizatı üretimlerinde biyoaktiviteyi arttırmak için farklı ekzopeptidaz kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla, Flavourzyme® (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) ve Protana™ Prime (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) enzimleri çalışmada tek başlarına ve kombinasyon halinde denenmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Bkz: Bölüm 4.2) iki ekzopeptidaz enziminin, endopeptidaz enzimi ile beraber kullanımına karar verilmiştir. Elde edilen kazein hidrolizatının biyoaktif özelliklerini daha da arttırmak üzere ise işlem koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada da inkübasyon süresi, ekzopeptidaz konsantrasyonu ve ultrases ön işlem uygulamasının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eldesinde belirlenen en uygun endopeptidaz Neutrase® 0.8 L, ekzopeptidaz ise Flavourzyme® ve Protana™ Prime enzimleri olmuştur. Kazein hidrolizatı eldesi için, üretilmiş olan kazein fosfat tamponunda eritme peyniri üretim tekniğinden yararlanılarak çözündürülmüş ve %7,5 kazein içeriğinde kazein çözeltisi elde edilmiştir. Çözündürme işleminde Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Almanya) cihazından ve Bas vd. (2019) çalışmasında uygulanan yöntemden yararlanılmıştır. Elde edilen çözelti %65 genlikte, kırık buz içerisinde 30 dakika boyunca kesikli (1 saniye çalış, 1 saniye dur) bir ultrases (US) ön işlemine tabi tutulmuştur (T103 problu, Sonoplus, Bandelin, Almanya). Kazein çözeltisi içerisine kazein bazında %1,25 Neutrase®, %0,5 Flavourzyme® ve %0,5 Protana™ Prime enzimleri ilave edilmiş ve 45 °C’de 200 rpm karıştırma hızında 20 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimatik reaksiyon, 90 °C’de su banyosunda 15 dakikalık bir ısıl işlemle sonlandırılmıştır ve sonrasında elde edilen hidrolizat 8.000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakikalık bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur (Nüve, NF800, Ankara, Türkiye). Santrifüj sonrası üst faz toplanmıştır. Toplanan üst faz analiz edilmiş ve ayran üretiminde kullanılmıştır.

3.2.4. Ayran Üretimi

Bu tez çalışmasında ayran üretimleri literatürde belirtilen yönteme göre, kuru maddesi standardize edilen sütün fermentasyonu sonucunda elde edilen metot ile elde edilmiştir (Koçak

ve diğerkleri, 2006). Ayran üretiminde, sütlerin inokülasyon öncesinde katı madde miktarlarının seyreltilerek %7 olması planlanmış ve ilave edilecek kazein hidrolizatları da bu hesaplamada dikkate alınarak üretimler gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda kazein hidrolizati ilave oranları, son ürün olarak ayranın kuru madde içeriğı sabit olacak şekilde belirlenmiştir ve kazein hidrolizatlarının %1, %5 ve %10 oranlarında ayrana ilave edilmesine karar verilmiştir.

Kuru madde miktarı standardize edilen sütlerin fermentasyonu için içerisinde *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* türlerinin bulunduğu kültürden (YoFlex® Classic 1.0, Chr. Hansen, Hoersholm, Danimarka) %0,01 oranında kullanılmıştır. 2,5 saatlik inkübasyon süresi sonunda örneklerin pH değerkleri 4,5-4,6 aralığına gelmiş ve üretilen ayran örneklerine bu aşamada % 0,75 oranında tuz eklenip Ultra-Turrax (IKA T18, Staufen, Almanya) cihazında 90 saniye 5000 rpm’de karıştırılmıştır. Elde edilen ayran örnekleri 100 mL’lik steril numune kaplarında ve +4 °C’de analiz edilinceye kadar depolanmıştır. Üretilen ayran örneklerinin 14 gün boyunca depolanmış ve depolamanın 1, 7 ve 14.günlerinde örnek alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde depolama boyunca ayran örneklerinin duysal özellikleri, renk, toplam asitliklik, pH, toplam peptit miktarı ve bazı biyoaktivite değerkleri (antioksidan aktivite, antidiyabetik aktivite) belirlenerek sonuçlar değerklendirilmiştir.

3.3. Analizler

3.3.1. Toplam Peptit Miktarının Belirlenmesi

Kazein hidrolizatlarının hidroliz düzeylerine dair fikir sahibi olunabilmesi için, örneklerin toplam peptit miktarları analiz edilmiştir. Bilindiğı üzere, *o*-fitaldialdehit (OPA) bileşığı, proteinlerin amino gruplarıyla bağ yapma eğilimindedir. Ortamda β-merkaptetanöl bileşığı de bulunduğu durumda OPA ve amino gruplarının oluşturduğu kompleks 340 nm’de absorbands vermektedir. Ortamda bulunan amino grubu sayısı ile 340 nm’deki absorbands artar. Protein yapısı parçalandıkça OPA ile reaksiyon verebilen amino grubu sayısı da artar. Bu şekilde, proteoliz düzeyine dair fikir elde edilir. Bu reaksiyon pH 9,0’un üzerindeki koşullarda kararlı sonuçlar verir. Bundan dolayı çözeltiler borat tamponunda hazırlanır. Aynı zamanda bu reaksiyon ile 340 nm’deki absorbands ilk 1-1,5 dakika artarken, sonra 3.dakikaya kadar görece kalıcı olur, daha sonra ise azalır. Dolayısıyla, hassas ölçümler için 2 dakikalık inkübasyon süresine uymak gerekir (Church ve diğerkleri, 1983).

Çalışma kapsamında, örneklerin toplam peptit miktarının belirlenmesinde Church vd. (1983)'de belirtilen yöntemden yararlanılmıştır. Öncelikle OPA çözeltisi hazırlanmıştır. OPA çözeltisinin hazırlanmasında, 50 mL'lik balonjoje alınıp, içerisine 100 mM sodyum tetraborat çözeltisinden 25 mL ilave edilmiştir. Sonrasında, üzerine %20'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisinden 2,5 mL eklenmiştir. Daha sonra 10 mL'lik bir beherde 40 mg OPA tartılmış ve üzerine eklenen 1 mL metanolde çözündürülmüştür. Bu çözelti de, balonjojeye aktarılmıştır. Beher içeriği, balon joje içeriği ile birkaç kez yıkanmıştır. Balonjojeye β -merkaptotanol çözeltisinden 100 μ L ilave edilmiş ve içerik saf su ile tamamlanmıştır. Bu OPA çözeltisi günlük olarak hazırlanarak analizlerde kullanılmıştır. Analiz için, örneklerden 50 μ L spektrofotometre küvetine alınmıştır. Üzerine 1 mL OPA çözeltisi ilave edilmiş ve küvet içeriği pipetleme ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılan küvetlerde oluşan renk 340 nm'de her bir örnekten 3 paralel olacak şekilde ölçülmüş ve toplam peptit miktarı tripton ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle tripton eşdeğeri olarak TPM değerleri hesaplanmıştır.

3.3.2. Antioksidan Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi

Kazein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi üç farklı yöntemle analiz edilerek değerlendirilmiştir. Serbest radikal süpürme kapasitesi sonuçlarının değerlendirilmesinde troloks eşleniği kullanılmıştır. Bu yöntemde, örneklerin suda çözünür ekstraktlarının ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)) radikallerini nötralize etme kapasiteleri ölçülmüştür. Re ve diğerleri (1999), tarafından tanımlanan ABTS katyon radikallerinin bağlanma kapasitelerinin ölçülmesi 0,1 mL örnek çözeltisi ile 1,9 mL 7 mmol/L ABTS radikal çözeltisinin (2,5 mmol/L potasyum persülfat içerisinde hazırlanmış) verdiği reaksiyonun 6 dakika boyunca kinetik olarak 734 nm'deki absorbans değerinde meydana gelen değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir (Re ve diğerleri, 1999). Ölçümler görünür ve UV bölgede ölçüm yapabilen bir spektrofotometre (Agilent, Carry 60, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. ABTS radikal çözeltisinin başlangıç absorbans değeri 0.700 ± 0.020 olacak şekilde pH 7.4 75 mmol/L tuzlu fosfat tamponu (150 mmol/L NaCl içeren) kullanılarak ayarlanmıştır.

DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali) kullanılarak gerçekleştirilen antioksidan aktivite ölçüm yöntemi anlatıldığı şekilde yapılmıştır (Brand-Williams ve diğerleri, 1995; Kim ve diğerleri, 2002). 0,1 mL örnek çözeltisi 3,9 mL DPPH (0,06 mmol/L metanol olacak şekilde hazırlanmış) ile 30 dakika boyunca reaksiyona sokulmuş ve ardından çözeltinin 517 nm'de

absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Agilent Carry 60). DPPH çözeltisinin başlangıç absorbans değeri $0,700 \pm 0,020$ olacak şekilde 0,06 mmol/L metanol kullanılarak ayarlanmıştır. Ancak çalışmada kullanılan kazein hidrolizatları, alkol içerisinde çözünürlüklerini kaybedip bulanıklığa yol açmışlardır. Bu sebeple doğru ve tekrarlanabilir ölçüm sonuçları elde edilememiştir. Bundan dolayı, DPPH analizi yerine suda çözünür ABTS katyon radikali kullanılarak yapılan analizlerle antioksidan aktivite değerlendirilmiştir (Re ve diğerleri, 1999).

Örneklerin demir iyonlarını şelatlama kapasiteleri de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Carter, 1971). 2 mL uygun oranda seyreltilmiş örnek çözeltisi 0,1 mL 1 mmol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile karıştırılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 0,1 mL 5 mmol/L ferrozin ilave edilerek karıştırılmış ve 10 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak 562 nm’de ölçülmüş ve sonuçlar EDTA cinsinden ifade edilmiştir.

3.3.3. Antihipertansif Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi

Kazein hidrolizatlarının antihipertansif aktivitelerinin belirlenmesi için, anjiyotensin dönüştürücü enzimi (angiotensin converting enzyme, ACE) inhibe etme özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, Shalaby ve diğerleri (2006)’de açıklanan yöntem ile analizler gerçekleştirilmiştir (Shalaby ve diğerleri, 2006). İlk olarak, 40 μL örnek çözeltisi Eppendorf tüplerine alınmış ve üzerine 0,01 M tuzlu fosfat tamponu (pH: 7,0, NaCl konsantrasyonu: 0.5 M) içerisinde hazırlanmış olan 40 μL 0,1 ünite/mL ACE ilave edilmiştir. Karışım 15 dakika 37 °C’de inkübe edilmiş ve ardından tuzlu fosfat tamponunda hazırlanmış 600 μL 0,75 mM substrat çözeltisi (FAPGG, N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon 30 dakika boyunca 37 °C’de sürdürüldükten sonra, örnekler spektrofotometre kuvvetlerine aktarılmış ve üzerlerine 320 μL tampon çözeltisi ilave edildikten sonra, bekletilmeden 340 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

Substrat örneğinin ölçülmesi: Boş eppendorf tüpüne örnek ve enzim yerine methotta yazan miktarlarda PBS eklenir ve sonraki süreçler aynen gerçekleştirilir. Örneğin; inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlendiyse, aşağıdaki şekilde analizler gerçekleştirilir. Berrak halde bulunan örnekten 40 μL alınıp, Eppendorf tüpüne eklenir. Örneklerde berraklık sorunu varsa veya yapılan ön denemelerde inkübasyon sonrası berraklık sorunu yaşıyorsa; örnekler önce yüksek devirde santrifüj edilir, sonra berrak kısımdan örnek alınarak çalışılır. Üzerine 40 μL 0.1 U/mL ACE eklenip, 15 dakika 37 °C’de su banyosunda (Eppendorf tüpleri kapalı ve dik duracak

şekilde) bekletilir. Sonra Eppendorf tüplerinin üzerine 740 µL, 0.75 mM FAPGG ilave edilir ve 75 dakika 37 °C’de su banyosunda inkübe edilir. Daha sonra örnekler eppendorf tüplerinden, mikro küvetlere alınır ve üzerine 400 µL tampon çözeltisinden (PBS) eklenerek, hacim 1000 µL’ye tamamlanır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak 340 nm’de ölçülür. Sonuçlar kaptopril ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemle beraber captopril eşdeğeri cinsinden hesaplanır.

$$\%inhibisyon = \frac{(A_{\text{örnek}} - A_{ACE})}{(A_{\text{substrat}} - A_{ACE})} \times 100$$

3.3.4. Antidiyabetik Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi

Üretilen kazein hidrolizatlarının antidiyabetik etkilerinin incelenmesinde iki farklı yöntemden yararlanılmıştır. Bu kapsamda, örneklerin antidiyabetik aktiviteleri α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerinin aktivitelerinin inhibe edilme düzeylerine göre belirlenmiştir.

Çalışmada α-amilaz enziminin inhibisyonu aşağıda verilen yöntemle gerçekleştirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2004). Yöntemde, α-amilaz enzimi içeren ağız benzeri bir ortam hazırlanmış ve bu ortama substrat olarak nişasta ilave edilerek nişasta parçalanma ürünlerinin miktarı belirlenmeye çalışılmıştır (Çam ve İçyer, 2015). Nişasta parçalanma ürünleri kapsamında belirlenen ise indirgen şekerlerdir. Bunun için indirgen şekerlerin ölçülmesinde yaygın kullanılan bir yöntem olan 3,5-Dinitrosalicylic asit (DNS) kolorimetrik yöntemi kullanılır. Yöntem, alkali koşullar ve ısı uygulaması ile şekerlerin fonksiyonel gruplarının (serbest halde bulunan karbonil gruplarının) oksidasyonu ve DNS’in indirgenerek 3-amino-5-nitrosalicylic aside dönüşümüne dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan 3-amino-5-nitrosalicylic asit 540 nm’de ışığı absorbe eder ve absorpsiyonun belirlenmesi ile ortamda oluşan indirgen şeker miktarı arasında ilişki kurulur. İşlem sırasında ortama sodyum potasyum tartrat ilavesi, ortamdaki iyon konsantrasyonunun artmasını ve çözünmüş oksijen miktarının azalmasını sağlar; bu şekilde, işlemin etkinliği artar (Miller, 1959). Özetle, α-amilaz etkinliği ile nişasta parçalanır, indirgen şekerler açığa çıkar ve indirgen şekerlerle DNS arasındaki reaksiyon sonucu 540 nm’de absorpsiyon veren bileşikler oluşur. Bu bileşiklerin oluşumu azalırsa, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu kapsamda, 10 unite/mL’lik α-amilaz enziminden 100 µL bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 µL örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 5 dakika 37

°C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 250 µL %1’lik nişasta çözeltisinden ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 200 µL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve karışım 95 °C’de 10 dakika bekletilip, ardından karışıma 1 mL saf su ilave edilip oda sıcaklığına hızla gelmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen çözeltide oluşan renk, spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülmüştür.

Çalışma kapsamındaki diğer antidiyabetik aktivite analizinde ise örneklerin α -glukosidaz enzimini inhibe etme yeteneği Kim ve diğerleri (2004)’de belirtilen yöntemle ölçülmüştür. Yöntem, α -glukosidaz enziminin 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside bileşiğinin parçalanmasını sağlaması ve bu parçalanma reaksiyonu sonucu oluşan *p*-nitrophenol bileşiğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Oluşan *p*-nitrophenol bileşiği 400 nm’de absorbans vermektedir ve bu bileşiğin konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasında ilişki tanımlanmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu azalırsa, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu amaçla, tuzsuz fosfat tamponunda hazırlanmış olan α -glukosidaz enziminden (0,1 ünite/mL) 100 µL bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 µL örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 10 dakika 37 °C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 100 µL 10 mM’lık substrat çözeltisinden (pNPG, 4-nitrofenil α -D-galaktopiranosit) ilave edilmiş, enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 60 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 1 mL 0,1 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyon durdurulmuştur. Çözeltide oluşan renk spektrofotometrik olarak 400 nm’de ölçülmüştür.

3.3.5. Lipaz İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz inhibisyon denemesi (McDougall ve diğerleri, 2009; Tan ve diğerleri, 2017; Yang ve diğerleri, 2002) tarafından sunulan metotda bazı modifikasyonlar yapılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. *p*-Nitrophenol palmitate (pNPP) substrat olarak kullanılmıştır. Kısaca, 1800 µL 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,6, sodyum kolat (1,15 mg/mL) ve arabik gum (0,55 mg/mL) içeren) 100 µL lipaz enzimi (5 mg/mL, suda) (Tip 2, 100-400 units/mg, L3126, Sigma) ile karıştırılmıştır. Daha sonra 100 µL örnek reaksiyon ortamına eklenmiştir. 200 µL dimetilsülfoksitte hazırlanan pNPP (%0,03’lük) eklendikten sonra 37 °C’de 30 dakika boyunca reaksiyon tüpleri inkübe edilmiştir. Kontrol örneği için örnek yerine aynı miktarda (100 µL) saf su eklenmiş, kör örneği için ise enzim yerine saf su kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından 410 nm’de spektrofotometrede okuma yapılmıştır.

3.3.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Analizlerde kullanılan kazein hidrolizat örnekleri önce liyofilize edilmiş, sonrasında liyofilize örneklerle steril destile su eklenerek belirlenen/belirtilen konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Mikrofiltreden (0,22 µm çap) geçirilen örneklerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde kuyucuk difüzyon yönteminden yararlanılmıştır (Rizzello ve diğerleri, 2005). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kazein hidrolizatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, iki mikrobiyal suş, *E. coli* ATCC25922 (Gram -) ve *S. aureus* ATCC29213 (Gram +) hedef alınmıştır. Mikroorganizmalar sıvı Luria Broth ya da M17 broth besiyeri içerisinde çalkalamalı inkübatör ve 36 °C ortam sıcaklığında gece boyunca (16-18 saat) geliştirilmiştir. Elde edilen sıvı bakteri kültürlerinin hücre yoğunluğu standart ayarlı bir densitometre yardımıyla 0,5 McFarland değerine (10^6 koloni oluşturan birim, KOB/mL) ayarlanmıştır. Uygun hacimdeki (100 µL) bakteri süspansiyonu petri plaklarında agar eklenerek elde edilen katı büyüme ortamı yüzeyine yaydırılmıştır. Daha sonra plaklarında yaklaşık 0,6 cm çapında kuyucuklar açılmış ve eşit hacimde (50 µL) peynir çözeltilisi örnekleri kuyucuklara yerleştirilmiştir. Bakteri plakları 24 saat 36 °C’de inkübe edilerek kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon alanlarının yarıçapları ölçülmüştür. Ölçümlerde genel etkili antibiyotikler olan Chloramphenicol (50 µg) ve Cefotaxime (50 µg) bakteri büyümesini engelleyen pozitif kontroller olarak kullanılmıştır.

3.3.7. Duyusal Analiz

Tez çalışmasında optimum koşullarda üretilen, yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizati eklenen ayranların duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 3 farklı hidrolizat konsantrasyonunda (%1, %5 ve %10) üretilen ayranlar depolanmış ve depolamanın 3 farklı süresinde (1., 7. ve 14. gün) analiz edilmiştir. Bu çalışma, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde, seçilen 10 panelist ile gerçekleştirilmiştir. Panelistlere, tez çalışması kapsamında kazein hidrolizati üretim süreci açıklanmış ve ayranın duyusal özellikleri konusunda eğitim verilmiştir. Kontrol örneği olarak, kazein hidrolizati içermeyen ayran örneği panelistlere sunulmuştur. Duyusal analizde, panelistlerden örneklerin kıvamı, parçacıklı/pıhtılı yapısı, rengi, ayrana yabancı lezzet ve genel beğeni gibi kriterlere göre değerlendirme yapmaları istenmiştir. Duyusal analizler, günde iki oturumda yapılmış, sabah oturumları 10.00-10.30, öğle oturumları ise 14.00-14.30 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Sonuç değerlendirme skalası Şekil Ek 1’de verilmiştir.

3.4. Deneyisel Tasarım, İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon

Tezin ikinci aşamasında asit kazeinden, yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı üretimi sürecinde, öncelikle kullanılan endopeptidaz tipi, inkübasyon süresi ve ultrases ön işlemi uygulamasının etkisi incelenmiştir. Bu aşamada 3 farklı ticari endopeptidaz (Neutrase® 0.8 L, Alcalase® 2.4 L ve rTrypsin® 800 USP/mg), 4 farklı inkübasyon süresi (2, 4, 8 ve 12 saat) ile ultrases ön işlem uygulamasının varlığı veya yokluğu çalışılmış, toplam 24 hidrolizat üretilmiş ve bu hidrolizatlar içerisinde en yüksek biyoaktif özelliklere sahip olanı, bir çeşit karar verme tekniği olan “Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution (TOPSIS)” yöntemi ile belirlenmiştir.

Sonrasında (tezin üçüncü aşamasında), en yüksek biyoaktivite özelliklerinin belirlendiği Neutrase enzimi ile birlikte hidrolizatların biyoaktif özelliklerini geliştirmek üzere 2 farklı ticari ekzopeptidazın (Flavourzyme® ve Protana™ Prime) tek tek veya kombinasyon halinde uygulanması incelenmiştir. Bu hidrolizatlar içerisinde en yüksek biyoaktif özelliklere sahip olanı TOPSIS yöntemi ile belirlenmiştir.

Yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eldesindeki son aşamada (tezin dördüncü aşaması) ise işlem koşullarının optimizasyonu 3 faktörlü merkezi karma döneel tasarım (central composite rotatable design, CCRD) deneme planına göre yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology, RSM) ile gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda inkübasyon süresi (10-20 saat aralığında), ekzopeptidaz konsantrasyonu (%0-%1,0 aralığında) ve ultrases ön işlem süresi (0-30 dakika aralığında) faktörleriyle çalışılmış ve yüksek biyoaktivite hedefi ile optimum nokta istenilirlik fonksiyonu yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre; %0,5 ekzopeptidaz konsantrasyonu, 30 dakikalık ultrases ön işlemi ve 20 saatlik inkübasyonla en yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı elde edilebilmiştir. Bu aşamadaki çalışmalar kapsamında, optimizasyon aşamasında elde edilen sonuçların değerlendirmesini desteklemek ve faktörlerin modellenen veya modellenemeyen yanıtlar üzerindeki etkilerini yorumlamak ve CCRD deneme planı ile elde edilen sonuçları desteklemek üzere, ek üretim ve analizler gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, kazein hidrolizatı üretimindeki işlem koşullarının hidrolizatların biyoaktivitelerine etkilerinin saptanması için 7 farklı işlem koşulunda, 3 tekerrürlü olacak şekilde üretimler yapılmıştır. Bu deneme planlanmasında belirlenen işlem koşulları, optimizasyon çalışmasındaki sınır koşulları ile aynıdır ve CCRD doğrultusunda

yapılan üretimlere ek olarak 12 farklı üretim daha gerçekleştirilerek, deneme planı tamamlanmış ve işlem koşullarının etkileri incelenebilmiştir. Daha sonrasında ise hesaplanan optimum noktanın deneysel olarak doğrulamasının yapılması amacıyla, belirlenen optimum koşullarda ek üretimler yapılmış ve üretilen hidrolizatlar analiz edilmiştir. Optimizasyonda tahminlenen analiz sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiş, karşılaştırmada tek grup T-testi'nden yararlanılmıştır.

3.4.1. Çok Kriterli Karar Analizi (TOPSIS)

Tez çalışmasının ikinci aşaması olan yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eldesinde uygun endopeptidaz tipinin, inkübasyon süresinin ultrases ön işleminin varlığının/yokluğunun belirlenmesinde ve üçüncü aşaması olan uygun ekzopeptidaz tipi ile kombinasyonunun belirlenmesinde, çok sayıda örneğin çok sayıda özelliğinin eşzamanlı değerlendirilerek en uygun olanının belirlenmesi gerekmiştir. Tezin ikinci aşamasında 24 hidrolizat üretilmiş ve bu aşamada üretilen örneklerin antihipertansif aktivite (ACE inhibisyon), antioksidan aktivite (serbest radikal bağlama, ABTS), antidiyabetik aktivite (α -amilaz inhibisyon) ve lipaz inhibisyon aktivitesi özellikleri maksimum olan örnek belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, biyoaktif peptit çalışmaları açısından özel önem taşıyan antihipertansif aktivite %40 ağırlıkla değerlendirilirken, diğer 3 biyoaktif özellik %20'şer ağırlıkla analize alınmıştır. Sonrasında (tezin üçüncü aşamasında), ise üretilen hidrolizat örneklerinin antihipertansif, antioksidan ve lipaz inhibisyon aktiviteleri değerlendirilerek en yüksek biyoaktiviteye sahip hidrolizat örneğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Biyoaktivite özellikleri açısından antihipertansif aktivite %40 ağırlıkta, diğer üç biyoaktif özellikler ise %20 ağırlıkta değerlendirilmiştir.

Bu tip durumlarda, yani çok kriterli karar verme durumlarında kullanılan istatistiksel yöntemlerden birisi “Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution (TOPSIS)” yöntemidir. Bu yöntem 1981 yılında Hwang ve Yoon tarafından geliştirilmiştir (Hwang ve diğerleri, 1981). Bu yöntemin avantajı kompleks algoritmalar ve karmaşık matematiksel modeller içermemesi ve uygulanmasındaki kolaylıklardır. Yöntemin özünde, en ideal (pozitif ideal) ve idealden en uzak değerlerin (negatif ideal) deneysel verilerden elde edilmiş sonuçlar matrisinden hareketle tanımlanması ve analiz edilen örneklerin bu pozitif ve negatif ideal noktalarına olan geometrik uzaklıklarının oranlarının değerlendirilmesi bulunmaktadır (Himmetagaoglu ve diğerleri, 2018).

TOPSIS ile analiz edilen örneklerden elde edilen verilerin, pozitif ve negatif ideal noktalara olan uzaklıklarından, bu noktalara benzerlikleri hesaplanmaktadır ve hesaplanan değer C değeri veya “görelî yakınlık” değeri olarak adlandırılmaktadır. Görelî yakınlık değeri 0 ile 1 arasında bir değerdir ve 1’e yakın olması tercih edilmektedir. Tez çalışması kapsamında üretilmiş her bir örnek için bir görelî yakınlık değeri elde edilmiş ve bu değerler değerlendirilerek, en uygun örneğe karar verilmiştir.

3.4.2. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Optimizasyon

Tez çalışmasında, yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eldesinde, inkübasyon süresi, ekzopeptidaz konsantrasyonu ve ultrases ön işlem uygulamasının RSM ile optimizasyonu yapılmıştır.

Seçilen 3 faktörü CCRD deneme planında; 2^3 faktöriyel tasarıma, 6 adet merkez noktası ve 6 adet eksenel nokta ($\lambda=1,682$) eklenmiş ve toplam 20 deneme noktası belirlenmiştir. Bu aşamada ikili faktör etkileşimi yapılmış ve en iyi sonuçların kuadratik yöntem ile belirlendiği gözlemlenmiştir. Optimizasyon çalışmasında kullanılan faktörlerin seviyeleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Ek olarak optimizasyon çalışmasında kullanılan faktörlerin seviyeleri kullanılarak oluşturulan deneme deseni Tablo 3.2’de verilmiştir.

Optimizasyon amacıyla üretilen 20 örneğin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda üretilen örneklerin toplam peptit miktarı ile 6 farklı biyoaktif özellik (serbest radikal süpürme kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, ACE inhibisyonu, α -amilaz inhibisyonu, α -glukosidaz inhibisyonu ve lipaz inhibisyonu) analiz edilmiştir. Uygulanan deneme deseni doğrultusunda belirlenen yanıtlar, çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için işlem değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu analiz ile her bir faktörün yanıtlar üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerinin önemi %95’lik güven aralığında F -testi (Fischer testi) uygulanarak belirlenmiş, istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelin dışında bırakılmıştır. Elde edilen modelin deneysel verilerle uyumluluğuna, “*lack of fit*”, model regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı ($Adj-R^2$), tahminlenmiş hata kareler toplamı ($PRESS$), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı ($Pre-R^2$), değişim katsayısı ($C.V.$) ve yeterli kesinlik ($Adeq.Precision$) değerlerine bakılarak karar verilmiştir ($lack\ of\ fit > 0.1$; $R^2 > 0,9$; ($Adj-R^2 - Pre-R^2$) $< 0,2$; $max.PRESS$; $C.V.$

< 15 ; $Pre-R^2 > 0.7$; $Adeq.Precision > 4$) (Erbay ve Icier, 2009; Myers ve diğerleri, 2016). Model uyumluluğu sağlandıktan sonra, tanılayıcı grafikler ve durum istatistiklerinin hesaplanmasını içeren kalıntı analizleri yapılarak, ANOVA’da kullanılan kabullerin doğrulaması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Kazein hidrolizatı üretiminin optimizasyonu aşamasında kullanılan değişkenler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken (Faktör)	Birim	Kodlanmış Seviyeler				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
x ₁ , İnkübasyon Süresi	saat	10	12	15	18	20
x ₂ , Ekzopeptidaz Konsantrasyonu	%	0	0,2	0,5	0,8	1,0
x ₃ , Ultrases ön işlem süresi	dakika	0	6	15	24	30

Yapılan modelleme ve istatistiksel değerlendirmeler doğrultusunda, analiz edilen 6 biyoaktif özellikten birisi uygun model vermediğinden (lipaz inhibisyon aktivitesi), birisi ise (α -glukosidaz inhibisyonu) uygun model vermiş olsa bile incelenen değerler birbirine çok yakın olduğundan ve bu küçük değerlerdeki farklılaşmanın pratikte anlamlı sonuçlar vermeyeceği düşünüldüğünden optimizasyonda yanıt olarak değerlendirilmemiştir. Kalan 4 biyoaktif özellik (serbest radikal süpürme kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, ACE inhibisyonu ve α -amilaz inhibisyonu) optimizasyonda yanıt olarak kullanılmıştır. Optimizasyonda tüm yanıtların maksimize edilmesine çalışılmıştır. Optimizasyonda, modellenen yanıtlarla ilgili belirlenen bu hedefler doğrultusunda, her bir yanıt için belirlenen modellerin eş zamanlı çözümüne dayanan “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi kullanılmıştır. Yanıt olarak değerlendirilen 4 biyoaktif özellikten antihipertansif potansiyel (ACE inhibisyonu aktivitesi) peptitlerde hedeflenen en önemli özellik olduğundan, bu özelliğin optimizasyondaki ağırlık katsayısı daha yüksek tutulmuştur. ACE inhibisyon aktivitesinin optimizasyondaki ağırlık katsayısı 5 birim olarak alınırken, diğer tüm aktivite özelliklerin ağırlık katsayısı 3 birim düzeyinde bir ağırlıkla optimizasyonda kullanılmıştır. Yanıt yüzeylerin oluşturulması, istatistiksel değerlendirme ve optimizasyonda Design Expert (Stat-Ease, 2005) programı kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kazein hidrolizatı üretiminin optimizasyonu için kullanılan deneme tasarımı

Üretim No	İnkübasyon Süresi (saat)	Ekzopeptidaz Konsantrasyonu (%)	US Süresi (dakika)
1	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
2	12 (-1)	0,8 (+1)	6 (-1)
3	10 (-1,68)	0,5 (0)	15 (0)
4	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
5	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
6	15 (0)	0 (-1,68)	15 (0)
7	18 (+1)	0,8 (+1)	24 (+1)
8	15 (0)	0,5 (0)	30 (+1,68)
9	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
10	12 (-1)	0,8 (+1)	24 (+1)
11	12 (-1)	0,2 (-1)	24 (+1)
12	15 (0)	0,5 (0)	0 (-1,68)
13	15 (0)	1,0 (+1,68)	15 (0)
14	12 (-1)	0,2 (-1)	6 (-1)
15	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
16	20 (+1,68)	0,5 (0)	15 (0)
17	18 (+1)	0,2 (-1)	6 (-1)
18	18 (+1)	0,8 (+1)	6 (-1)
19	15 (0)	0,5 (0)	15 (0)
20	18 (+1)	0,2 (-1)	24 (+1)

3.4.3. Örnekler Arasındaki Farkların İstatistiksel Olarak Belirlenmesi

Çalışmada analiz edilen örneklerin istatistiksel olarak benzerliklerinin ve farklılıklarının belirlenmesinde tek yönlü ANOVA analizinden yararlanılmıştır. Örneklerin sonuçlarından hareketle aralarındaki farklılıklar Duncan testine göre değerlendirilmiştir. Bu kapsamdaki istatistiksel analizler için SPSS istatistik programı (Versiyon:22, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Hammadde olarak yağsız çiğ inek sütünden üretilen asit kazein çözeltisinin, homojen ve kararlı bir dispersiyona dönüştürülmesi sonrası ultrases ön işlemlili veya ön işlemsiz olarak Alcalase®, rTrypsin® ve Neutrase® enzimlerini kullanılarak, 12 saate kadar inkübasyonu ile hidroliz işlemi sağlanmıştır. Kazein hidrolizatlarının inkübasyonun 2., 4., 8. ve 12. saatlerinde örnek alınmış ve örneklerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Hidrolizat üretiminin bu aşamasında, örneklerin antihipertansif aktivite, ABTS katyon radikal bağlama kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, α -amilaz inhibisyon aktivitesi, α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi, lipaz inhibisyon aktivitesi ve antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Analiz sonuçları toplu olarak Tablo 4. 1 ve Tablo 4. 2’de paylaşılmış, ilgili biyoaktif özelliğe dair açılan alt başlık altında sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.1. Kazein Hidrolizatı Üretiminde Yüksek Biyoaktivite Sağlayan Endopeptidaza Karar Verilmesi

Bu aşamada en yüksek biyoaktivite sağlayan endopeptidazın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle çalışılacak işlem koşulları ön denemelerle belirlenmiştir. Daha sonra, bu ön denemelerle belirlenen işlem koşullarında kazein hidrolizat üretimleri ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Kazein hidrolizatlarının bu aşamadaki biyoaktivite analizleri kapsamında antihipertansif aktivite ile ABTS radikal bağlama kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, antidiyabetik aktivite analizleri (α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi), lipaz inhibisyon aktivitesi ve antimikrobiyal aktivitesi özellikleri analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonrasında ise analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile en uygun endopeptidaza karar verilmiştir.

4.1.1. İnkübasyon Koşullarının Belirlenmesi

Kazein hidrolizat üretiminde işlem koşullarının belirlenmesi için ön deneme üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle her bir enzim için uygun inkübasyon sıcaklığına, sonra inkübasyon süresine ve son olarak da enzim konsantrasyonuna karar verilmiştir.

Öncelikle her bir enzim için inkübasyon sıcaklığına karar verilmek üzere farklı sıcaklıklarda hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde, her bir enzimden kazein bazında %0,05

oranında karışıma ilave edilmiş, 250 rpm karıştırma hızında çalkalamalı inkübatörde (IKA KS3000 IC Control, Staufen, Almanya) 40-60 °C aralığında 96 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresince hidrolizattan örnek alınarak, örneklerdeki toplam peptit miktarı belirlenmiş (yöntem Bölüm 3.3’de açıklanmıştır) ve bu şekilde hidroliz düzeyine dair fikir elde edilmiştir. Neutrase® enzimi ile 40 ve 45 °C’de, Alcalase® enzimi ile 45-65 °C’de ve rTrypsin® enzimi ile de 40-45 °C’de inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin çalışma düzeyleri açısından bu sıcaklıklar arasında önemli farklılıklar saptanamadığından tüm enzimlerle 45 °C’de çalışılmasına karar verilmiştir.

Bu süreçte, örneklerde mikrobiyal bozulma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda inkübasyon süresinin kısaltılması çalışmaların kolaylaşması açısından da uygun bulunmuştur. Bu doğrultuda, inkübasyon süresinin 24 saati geçmeyecek şekilde ayarlanmasına, bu sürede hidroliz düzeyinin maksimum seviyelere ulaştırılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, kullanılan enzim miktarının artırılması ile inkübasyon süresinin kısaltılması amacıyla farklı konsantrasyonlarda enzim ilavesi ile üretimler gerçekleştirilmiş ve örneklerin hidroliz düzeyleri analiz edilmiştir. Üretimlerde kullanılan enzim miktarı kazein bazında %0,05 ile başlatılmış ve kademeli olarak artırılmıştır. Ön deneme üretimleri ve analizleri sonucunda, 45 °C’de, 200 rpm karıştırma hızı koşullarında, Neutrase®, Alcalase® ve rTrypsin® enzimleri için uygun konsantrasyonların sırasıyla %1,25, %1,25 ve %2,50 olduğuna karar verilmiştir. Bu konsantrasyonlarda, 12 saatlik inkübasyon sonrası proteoliz düzeyinin artışının önemli ölçüde yavaşladığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, inkübasyon süresinin 12 saatle sınırlandırılmasına karar verilmiştir.

Bu aşamada, US ön işlemi uygulaması için ön denemelere başlanmıştır. Ultrases işlemi ile protein yapısında çeşitli modifikasyonların gerçekleşmesi ve bu şekilde hem proteinlerin enzimatik reaksiyonlara daha açık hale gelmesi, hem de hidroliz sonucu oluşan peptit profilinde değişikliklerin gerçekleşmesi beklenmektedir. Ancak aynı zamanda ultrases işlemi ile örnekte sıcaklığın da yükseleceği öngörüldüğünden, sıcaklık kaynaklı bir etkinin oluşmaması istenmiştir. Bu doğrultuda, maksimum güçte ultrases uygulamasının gerçekleştirilmesi ve işlem sırasında çözelti sıcaklığının 45 °C’yi geçmemesi hedeflenmiştir. Çalışmalarda ultrases homojenizatör cihazı (Bandelin, Sonopuls 4200, Berlin, Almanya), TS 103 probu ile beraber kullanılmıştır. Bu şekilde, 20 kHz sabit frekansta, maksimum oran olan %65 genlik oranında

sürekli ultrases uygulaması denenmiştir. Yapılan ön denemelerde, 50 mL’lik falkon tüplerine alınan 15 mL’lik kazein çözeltilerinin, kırık buz içeren borosilikat camların içerisine yerleştirilmesi durumunda, sıcaklık artışının 10 dakikalık sürekli ultrases işlemi süresince kontrol altında tutulabildiği görülmüştür. Ön denemeler kapsamında öncelikle 5 dakikalık ultrases ön işlemi, daha sonra ise 10 dakikalık ultrases ön işlemi uygulamaları denenmiş ve ön işlem sonrası yapılan hidroliz işlemi sonrasında elde edilen hidrolizatların toplam peptit miktarları analiz edilmiştir. Ön denemeler sonucunda ultrases işlemi ile hidroliz düzeyi üzerinde dramatik değişimlerin saptanmadığı görülmüş ve işlem etkisini maksimize etmek için uzun ultrases ön işleminin (10 dakika maksimum genlik koşullarında) yapılmasına karar verilmiştir.

4.1.2. Endopeptidaz Türünün ve İşlem Koşullarının Hidrolizat Biyoaktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

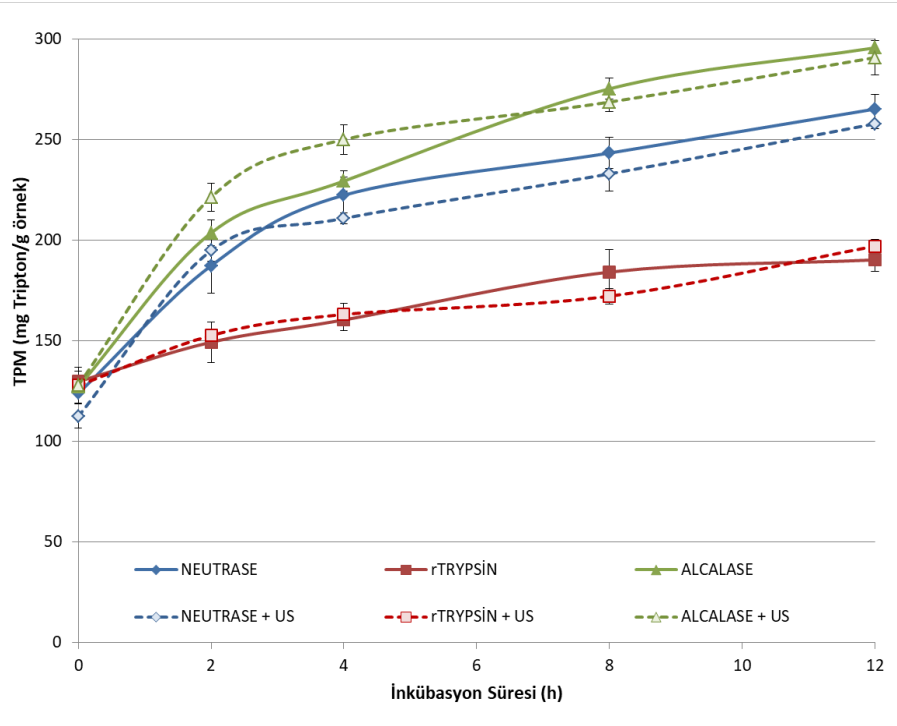
Ön deneme üretimleri ve analizleri sonucunda, tez kapsamında yapılacak kazein hidrolizat üretimlerindeki prosedürü ve deneme planı şu şekilde kesinleştirilmiştir:

Bu deneme planından hareketle, 3 farklı enzimle, 4 farklı inkübasyon süresinde, ultrases ön işleminin varlığında ve yokluğunda kazein hidrolizat üretimleri (toplam 24 farklı hidrolizat) gerçekleştirilmiştir. Üretimler 2 tekrarlı yapılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında üretilmiş olan hidrolizatların sadece antihipertansif ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ile en uygun endopeptidaza karar verilmesi öngörülmüştür. Ancak, tez çalışmasında bu analizlere ek olarak üretilen örneklerin antidiyabetik (α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyonu), antiobezite (lipaz inhibisyonu) ve antimikrobiyal aktivite potansiyelleri de incelenmiştir.

4.1.2.1. Hidrolizat Örneklerinin Toplam Peptit Miktarlarının Belirlenmesi

Farklı enzimler kullanılarak elde edilen hidrolizat örneklerinin toplam peptit miktarları belirlenmiştir. Analiz sonuçları Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de verilmiştir. Toplam peptit miktar analizi, örneklerin hidroliz düzeyleriyle ilgili fikir edinmek amacıyla yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, örneklerin toplam peptit miktarlarının 112,5-295,8 mg tripton/g örnek arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Örnekler arasından en düşük miktardaki değerlerin, inkübasyonun başlangıcındaki değerlerde olduğu saptanmıştır. Bu durum enzimlerin hidroliz işlemini etkin bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, tüm enzimlerin

kullanıldığı örneklerin inkübasyon sürelerinin artmasıyla toplam peptit miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Farklı enzimler ve ultrases önışlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarlarının inkübasyon süresi ile değışimi

Şekilde verilen Y eksen değeri mg Tripton/g örnek sonuçlarını temsil ederken, X eksen (h) inkübasyon süresi olarak saati temsil etmektedir.

Tablo 4.1. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarları ve antihipertansif ve antioksidan aktivite sonuçları

	Süre (Saat)	Toplam PeptitMiktarı (mg Tripton / g örnek)	Antihipertansif Aktivite (%) ¹	ABTS (μ mol Troloks / mL örnek)	Metal bağlama (%) ²
Alcalase®	0	127,2 $\pm$ 3,4 ^{a,B}	5,50 $\pm$ 0,28 ^{a,A}	391,1 $\pm$ 18,6 ^{a,A}	31,75 $\pm$ 0,21 ^{b,C}
	2	203,8 $\pm$ 6,5 ^{b,C}	48,95 $\pm$ 0,77 ^{b,B}	542,1 $\pm$ 22,8 ^{b,B}	30,35 $\pm$ 0,21 ^{ab,AB}
	4	229,5 $\pm$ 5,1 ^{c,C}	58,95 $\pm$ 0,07 ^{c,C}	603,9 $\pm$ 22,3 ^{c,B}	31,35 $\pm$ 0,63 ^{ab,A}
	8	275,4 $\pm$ 5,1 ^{d,E}	64,00 $\pm$ 0,28 ^{d,C}	657,8 $\pm$ 10,5 ^{d,B}	29,00 $\pm$ 1,13 ^{a,A}
	12	295,8 $\pm$ 5,7 ^{e,D}	68,95 $\pm$ 1,90 ^{e,C}	696,0 $\pm$ 22,9 ^{e,CD}	36,40 $\pm$ 1,83 ^{c,BC}
Neutrase®	0	124,0 $\pm$ 5,2 ^{a,B}	5,50 $\pm$ 0,28 ^{a,A}	415,1 $\pm$ 20,7 ^{a,B}	29,15 $\pm$ 0,07 ^{a,B}
	2	187,4 $\pm$ 13,4 ^{b,B}	67,45 $\pm$ 3,04 ^{b,D}	561,3 $\pm$ 14,0 ^{b,BC}	29,75 $\pm$ 0,63 ^{ab,A}
	4	222,5 $\pm$ 9,0 ^{c,C}	78,25 $\pm$ 0,91 ^{c,E}	624,9 $\pm$ 7,9 ^{c,B}	32,50 $\pm$ 1,27 ^{c,A}
	8	243,5 $\pm$ 7,7 ^{d,D}	83,60 $\pm$ 1,27 ^{d,E}	646,1 $\pm$ 12,2 ^{d,B}	29,05 $\pm$ 0,07 ^{a,A}
	12	265,3 $\pm$ 7,3 ^{e,C}	84,15 $\pm$ 1,48 ^{d,E}	658,4 $\pm$ 20,6 ^{d,B}	31,40 $\pm$ 0,28 ^{bc,A}
rTrypsin®	0	129,8 $\pm$ 5,2 ^{a,B}	5,50 $\pm$ 0,28 ^{a,A}	492,8 $\pm$ 7,1 ^{a,D}	27,85 $\pm$ 0,07 ^{a,A}
	2	149,4 $\pm$ 10,1 ^{b,A}	36,55 $\pm$ 1,76 ^{b,A}	489,8 $\pm$ 8,6 ^{a,A}	31,00 $\pm$ 0,28 ^{b,AB}
	4	160,5 $\pm$ 5,4 ^{c,A}	38,5 $\pm$ 1,69 ^{b,A}	544,1 $\pm$ 24,1 ^{b,A}	33,10 $\pm$ 0,42 ^{c,A}
	8	184,3 $\pm$ 11,0 ^{d,B}	49,15 $\pm$ 1,76 ^{c,A}	550,9 $\pm$ 14,3 ^{b,A}	33,25 $\pm$ 0,35 ^{c,B}
	12	190,3 $\pm$ 5,8 ^{d,A}	53,55 $\pm$ 5,44 ^{c,A}	564,4 $\pm$ 20,4 ^{b,A}	37,45 $\pm$ 0,77 ^{d,C}
Alcalase® + US	0	128,0 $\pm$ 9,0 ^{a,B}	3,05 $\pm$ 1,62 ^{a,A}	403,4 $\pm$ 12,5 ^{a,A}	36,25 $\pm$ 0,35 ^{d,E}
	2	221,5 $\pm$ 7,0 ^{b,D}	53,20 $\pm$ 0,84 ^{b,C}	554,4 $\pm$ 28,1 ^{b,BC}	33,65 $\pm$ 0,77 ^{c,C}
	4	250,2 $\pm$ 7,3 ^{c,D}	57,55 $\pm$ 0,21 ^{c,C}	627,5 $\pm$ 26,6 ^{c,B}	31,75 $\pm$ 0,21 ^{b,A}
	8	268,8 $\pm$ 4,7 ^{d,E}	65,20 $\pm$ 1,13 ^{d,C}	675,7 $\pm$ 12,0 ^{d,C}	29,10 $\pm$ 1,27 ^{a,A}
	12	290,9 $\pm$ 8,5 ^{e,D}	64,90 $\pm$ 0,14 ^{d,BC}	715,9 $\pm$ 23,9 ^{e,D}	34,55 $\pm$ 0,07 ^{cd,B}
Neutrase® + US	0	112,5 $\pm$ 5,6 ^{a,A}	3,05 $\pm$ 1,62 ^{a,A}	447,6 $\pm$ 9,8 ^{a,C}	33,20 $\pm$ 0,70 ^{b,D}
	2	194,9 $\pm$ 5,4 ^{b,BC}	65,95 $\pm$ 0,77 ^{b,D}	571,8 $\pm$ 13,1 ^{b,C}	31,65 $\pm$ 0,91 ^{b,B}
	4	211,0 $\pm$ 2,7 ^{c,B}	75,95 $\pm$ 0,77 ^{c,D}	628,5 $\pm$ 15,2 ^{c,B}	31,55 $\pm$ 0,77 ^{b,A}
	8	233,1 $\pm$ 8,5 ^{d,C}	79,10 $\pm$ 0,14 ^{d,D}	655,6 $\pm$ 13,2 ^{d,B}	28,75 $\pm$ 0,35 ^{a,A}
	12	258,0 $\pm$ 2,3 ^{e,B}	77,60 $\pm$ 0,56 ^{cd,D}	686,8 $\pm$ 7,6 ^{e,C}	31,40 $\pm$ 1,13 ^{b,A}
rTrypsin® + US	0	127,8 $\pm$ 4,7 ^{a,B}	3,05 $\pm$ 1,62 ^{a,A}	501,8 $\pm$ 14,0 ^{a,D}	35,80 $\pm$ 0,14 ^{d,E}
	2	152,7 $\pm$ 6,5 ^{b,A}	37,20 $\pm$ 0,28 ^{b,A}	507,9 $\pm$ 6,1 ^{a,A}	34,35 $\pm$ 0,49 ^{c,C}
	4	163,2 $\pm$ 5,6 ^{c,A}	42,70 $\pm$ 0,14 ^{c,B}	558,4 $\pm$ 20,2 ^{b,A}	32,40 $\pm$ 0,56 ^{b,A}
	8	172,3 $\pm$ 3,8 ^{d,A}	54,45 $\pm$ 0,49 ^{d,B}	562,0 $\pm$ 11,9 ^{b,A}	30,60 $\pm$ 0,70 ^{a,A}
	12	197,2 $\pm$ 3,3 ^{e,A}	59,05 $\pm$ 1,20 ^{e,AB}	572,5 $\pm$ 13,4 ^{b,A}	36,60 $\pm$ 0,42 ^{d,BC}

^{A-E} Aynı harfler, aynı inkübasyon süresindeki farklı enzimlerle üretilmiş kazein hidrolizatlarının biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

^{a-d} Aynı harfler, aynı enzim ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının inkübasyon süresince biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

US: Ultrases ön işleminin kazein hidrolizat üretiminde kullanımını temsil etmektedir.

¹ Analiz sonucu 8,550 mg protein/mL için verilmiştir.

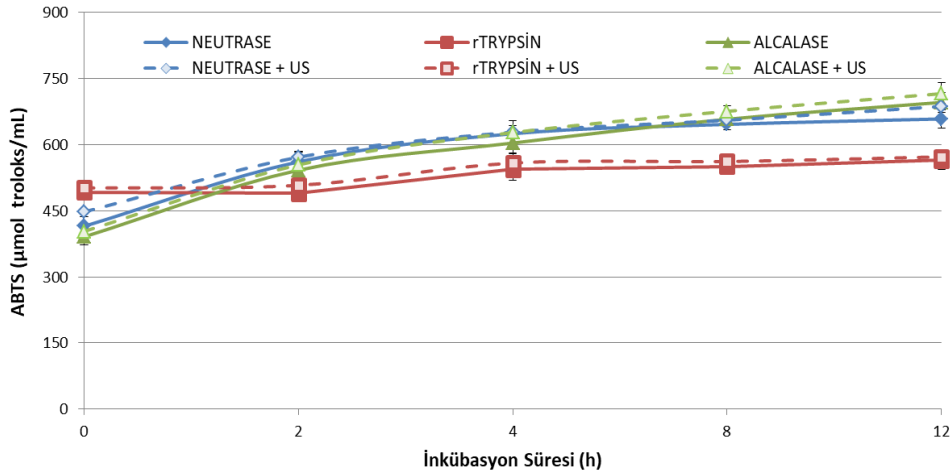
² Analiz sonucu 0,043 mg protein/mL için verilmiştir.

Kazein hidrolizat örneklerinde kullanılan enzimler içerisinde hidroliz düzeyi en yüksek hidrolizatın 12.saat inkübasyon süresinde Alcalase® enzimiyle sağlanmıştır. Alcalase® enzimi kullanıldığında, ultrases ön işlemi uygulanmaksızın, 12.inkübasyon saatinde en yüksek toplam peptit miktarları elde edilmiştir (290,9-295,8 mg tripton/g örnek). Hidroliz düzeylerinin yüksekliği açısından Alcalase® ve Neutrase® enzimi benzer sonuçlar gösterirken, rTrypsin® enzimi ile üretilen örneklerin toplam peptit miktar değerleri görece düşük sonuçlar vermektedir. (Naji ve Çam, 2024).

Ultrases ön işlem uygulamasının örneklerin toplam peptit miktarları üzerindeki etkisi önemli değildir ve genel olarak ultrases ön işlemlili veya ön işlemsiz üretilen örneklerde gözlemlenen toplam peptit miktarları istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0,05$). Alcalase® ve Flavourzyme® enzimlerini tek veya birlikte kullanılan bir çalışmada elde edilen kazein hidrolizatlarının hidroliz dereceleri ve antioksidan aktivitelerinin (ABTS katyon radikal süpürme) kombine şekilde elde edilen hidrolizatlarda daha yüksek değerlerde sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Rao ve diğerleri, 2020).

4.1.2.2. Hidrolizat Örneklerinin Antioksidan Aktivite Sonuçlarının Belirlenmesi

Çalışmadaki bulgulara göre üretimde kullanılan tüm enzimlerin ABTS radikal bağlama kapasitesini olumlu yönde etkilediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.). İnkübasyon süresi ile tüm hidrolizatların ABTS katyon radikal bağlama kapasite değerlerinin arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak, bu artış rTrypsin® enziminde diğer enzimlerin sonuçlarına göre görece azdır. Başlangıç örneği, rTrypsin® enzimi ile ultrases ön işlemi uygulanarak ve uygulanmadan 4 farklı inkübasyon süresinde üretilen örnekler, sadece 2 gruba ayrılabilmiştir. Bu bağlamda, rTrypsin®'in 0. ve 2.saat örnekleri ile 4., 8. ve 12.saat örnekleri birbirlerinden farklı bulunmamıştır ($p>0,05$). Buna karşın Neutrase® ve Alcalase® kullanılarak üretilen örneklerin hemen hemen tamamı, ABTS radikal bağlama kapasitesi açısından, inkübasyon süresinin artışı ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaşmıştır ($p<0,05$).



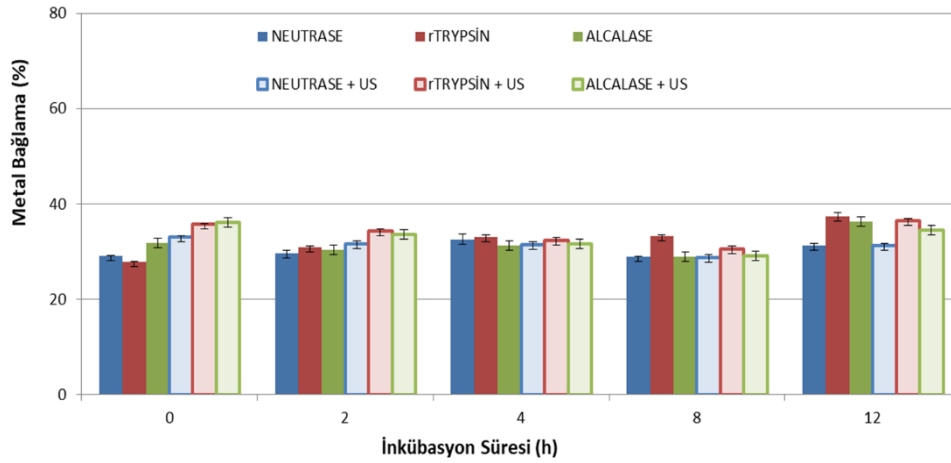
Şekil 4.2. Farklı enzimler ve ultrases ön işlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının serbest radikal süpürme kapasitesi olarak antioksidan aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi

ABTS katyon radikal bağlama kapasitesi en yüksek değerler ultrases ön işlem uygulanan Alcalase® enziminin 12 saatlik inkübasyonu sonucunda saptanmıştır. Ultrases ön işlemi yapılmış 0. andaki örneğin ABTS radikal bağlama aktivitesi, Alcalase® ile 12 saatlik inkübasyon sonucunda %77,5 oranında artarken Neutrase® enzimi ile üretilen örneklerde %54-58 aralığında, rTrypsin® ile üretilen örneklerde ise %14-15 aralığında değişmiştir. Sonuç olarak, toplam peptit miktarı en çok artan örnek Alcalase® örneği, aynı zamanda ABTS radikal bağlama aktivitesi de en çok artan örnek olarak saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, Alcalase®, Brouzyna ve Flavozyme enzimleri ile elde edilen keçi sütü kazein hidrolizatlarının en yüksek ABTS katyon radikal süpürme aktivitesinin Alcalase® enzimiyle elde edilen kazein peptitlerde olduğu belirtilmiştir (Magalhães ve diğerleri, 2022). Tripsin enzimi ile elde edilen kazein peptitlerinin hidroliz süresiyle doğru orantılı olarak ABTS katyon radikal süpürme yeteneklerinin de arttığı gözlemlenmiştir. 4, 5 ve 6 saatler arasında inkübasyon süresi bulunan örneklerin ABTS radikal süpürme kapasiteleri %55 ve %76 aralığında değişmiştir (Mokhtari ve diğerleri, 2023). Sonuçlar literatür değerleriyle uyumlu bulunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada ise Neutrase® ve Alcalase® enzimini birlikte veya kombine şekilde kullanıp elde edilen kazein hidrolizatların metal bağlama kapasiteleri %70 ve %83 aralığında değişmektedir. Çalışma sonuçları bu sonuçlarla uyumludur (Corrêa ve diğerleri, 2011).

Ultrases ön işleminin ABTS radikal bağlama kapasitesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise toplam peptit miktarındaki değişime benzer bir durum gözlenmiştir. Hidrolizat miktarının artışıyla ABTS radikal bağlama kapasitesi de dalgalanmalar olmakla beraber, ultrases ön

işleminin, üretilen kazein hidrolizatlarının ABTS radikal bağlama kapasitesi üzerinde önemli bir etki yaratmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Az sayıdaki örnekte gözlemlenen ultrases ön işlem etkisi ise, ABTS radikal bağlama kapasitesini artırma yönündedir. Literatürdeki bir çalışmada farklı enzimler ile elde edilen keçi sütü kazein hidrolizatı örneklerinin ultrases işleminin hidroliz derecesini, verimini ve antioksidan peptit üretiminde daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Magalhães ve diğerleri, 2022).

Üretilen kazein hidrolizatı örneklerinde bir diğer antioksidan aktivite olarak DPPH analizinin de belirlenmesi kararlaştırılmıştır. Ancak, DPPH çözeltisinin hazırlanmasında metanol kullanılması, ancak örneklerdeki bileşenlerin alkol içerisinde çözünürlüklerini kaybedip bulanıklığa yol açmaları nedeniyle, bu analiz yöntemiyle doğru ve tekrarlanabilir ölçüm sonuçları elde edilememiştir. Ayrıca üretilen tüm kazein hidrolizat örneklerinin metal bağlama kapasiteleri de ölçülmüştür (Şekil 4.3.). Analiz sonuçları değerlendirildiğinde kazein hidrolizatlarının metal bağlama aktivitesinin %27,9 ile %37,5 aralığında değiştiği görülmektedir. Metal bağlama aktivitesi açısından en yüksek değerleri, kullanılan enzimler arasında rTrypsin® enzimi sağlamaktadır. Sonuçlar incelendiğinde üretilen örneklerin metal bağlama aktivitesi değerlerinin, inkübasyon süresi ve ultrases ön işlemi uygulaması ile dalgalı bir değişim gösterdiği görülmüştür. Bu bağlamda yapılan farklı bir çalışmada ise Tyripsin enzimi ile elde ettikleri kazein hidrolizatlarının 4, 5 ve 6 saat sonrasında elde edilen metal iyonlarını bağlama kapasiteleri %21 ve %55 aralığındadır (Mokhtari ve diğerleri, 2023). Bu değerler çalışma sonuçlarımız ile uyumludur.

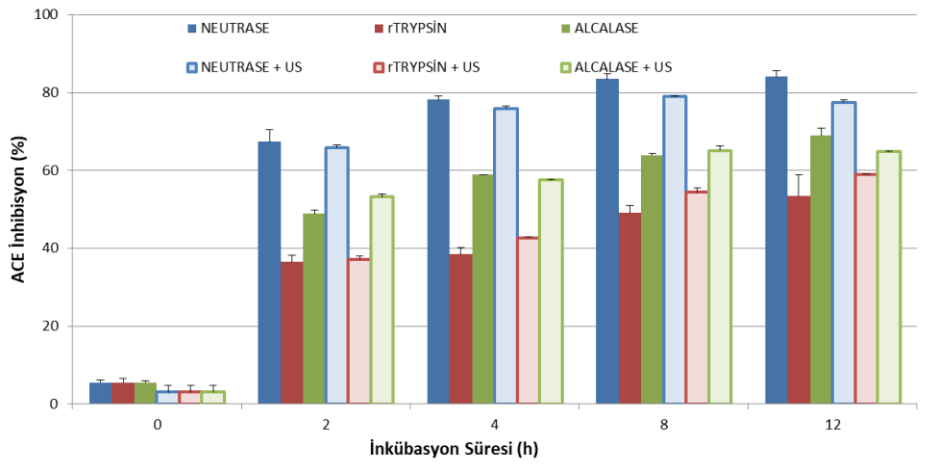


Şekil 4.3. Farklı enzimler ve ultrases önileme uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının metal bağlama kapasitesi olarak antioksidan aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi

Şekilde verilen Y eksen değeri % metal bağlama sonuçlarını temsil ederken, X eksen (h) inkübasyon süresi olarak saati temsil etmektedir.

4.1.2.3. Hidrolizat Örneklerinin Antihipertansif Aktivite Sonuçlarının Belirlenmesi

Üretilen kazein hidrolizatlarının antihipertansif aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, ACE enzimi inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Farklı enzimler ile üretilen kazein hidrolizatlarının antihipertansif aktivite değeri %3,1 ile %84,2 aralığında değişiklik göstermektedir. Kullanılan tüm enzimlerin antihipertansif aktiviteyi olumlu etkilediği görülmüştür. Hidroliz başlangıcında %3,1-5,5 aralığında ACE inhibisyonuna neden olan kazein dispersiyonlarının antihipertansif aktivitesi, endopeptidazlarla 2 saatlik enzimatik hidroliz sonrasında 7 kat artmıştır. İnkübasyon süresi arttıkça tüm enzimlerin antihipertansif aktiviteleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.4. Farklı enzimler ve ultrases önileme uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının ACE inhibisyon yüzdelerinin inkübasyon süresi ile değişimi

Şekilde verilen Y eksen değeri % ACE inhibisyon sonuçlarını temsil ederken, X eksen (h) inkübasyon süresi olarak saati temsil etmektedir.

Antihipertansif aktivite değeri en yüksek Neutrase® enzimi ile üretilen hidrolizat örneklerinde gözlemlenmiştir. Bu enzimle yapılan inkübasyonun 2. saati itibariyle, diğer enzimlerle ulaşılan aktiviteden istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bir aktiviteye ulaşılmış ve bu durum 12 saatlik inkübasyon süresince devam etmiştir ($p < 0,05$). Neutrase®'dan sonraki yüksek aktivite değerlerine Alcalase® enzimi ile ulaşılırken, rTrypsin® enziminin oluşturduğu aktivite görece düşük düzeylerde kalmıştır. Correa ve diğerleri, (2011) Alcalase® ve Neutrase® enzimlerini kullanarak kazein protein fraksiyonlarının biyoaktivitesini belirlemişlerdir. Sonuçlar hidroliz süresi boyunca %40 ve %94 aralığında değişiklik göstermektedir. Hidroliz süresinin artması ile biyoaktivite maksimum noktaya kadar artmış ve sonrasında ise azalmıştır. Bu literatür sonucu, ACE inhibisyon aktivitesi açısından tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyumludur (Corrêa ve diğerleri, 2011). Diğer bir çalışmada ise Neutrase® ve Flavourzyme® enzimleriyle elde edilen kazein hidrolizat fraksiyonlarının biyoaktivitelerini belirlemişlerdir. Neutrase® enziminin 12 saat hidrolizasyon süresi sonrası ACE aktivite değeri %73,3 belirlenirken Flavourzyme® enziminin oluşturduğu hidrolizatın ACE aktivite değeri %78,2 olarak belirlenmiştir (Naji ve Çam, 2024).

Ultrases ön işleme uygulaması ile üretilen hidrolizatların antihipertansif etkisi dalgalı bir seyir izlemiştir. Bunun nedeni çok hafif etki etmesi nedeniyle stabil bir etkinin belirlenememesidir.

Genel olarak rTrypsin® enzimi kullanılan örneklerde ultrases ön işlemleri olumlu etki gösterirken ($p<0,05$), diğeri enzimlerde kimi durumlarda olumsuz bir etki görölse de genel olarak anlamlı bir farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Kazein hidrolizatından elde edilen peptitlerin ultrases işleminin ACE aktivitesi üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir (Madadlou ve diğeri, 2011).

4.1.2.4. Antidiyabetik Aktivitenin Belirlenmesi

Üretilen kazein hidrolizatlarının antidiyabetik etki potansiyellerini belirlemek için α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiş ve Tablo 4.2’ de gösterilmiştir.

Buna karşın, örneklerin hiçbirisinde anlamlı bir α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi saptanamamıştır. Ayrıca, üretilen örneklerde belirgin bir α -amilaz inhibisyonu tespit edilemediği Şekil 4.5.’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının antidiyabetik ve lipaz inhibisyon aktiviteleri analizlerinin sonuçları

	Süre (Saat)	α -Amilaz İnhibisyonu(%) ¹	α -Glukosidaz İnhibisyonu (%) ²	Lipazİnhibisyonu (%) ³
Alcalase®	0	11,20 ± 0,40 ^{a,A}	ND	90,81 ± 0,93 ^{e,B}
	2	55,60 ± 0,70 ^{b,D}	ND	10,99 ± 1,24 ^{a,ABC}
	4	56,05 ± 1,20 ^{b,B}	ND	18,22 ± 2,35 ^{b,A}
	8	60,35 ± 0,49 ^{c,B}	ND	27,16 ± 0,07 ^{c,A}
	12	66,20 ± 0,98 ^{d,BC}	ND	33,37 ± 1,69 ^{d,AB}
Neutrase®	0	11,20 ± 0,40 ^{a,A}	ND	90,81 ± 0,93 ^{e,B}
	2	46,90 ± 0,56 ^{b,B}	ND	8,50 ± 1,87 ^{a,A}
	4	57,15 ± 1,48 ^{c,BC}	ND	19,98 ± 2,07 ^{b,AB}
	8	62,90 ± 2,68 ^{d,BC}	ND	26,01 ± 0,07 ^{c,A}
	12	62,80 ± 1,41 ^{d,B}	ND	36,05 ± 0,42 ^{d,BC}
rTrypsin®	0	11,20 ± 0,42 ^{a,A}	ND	90,81 ± 0,93 ^{d,B}
	2	27,20 ± 0,70 ^{b,B}	ND	16,46 ± 2,90 ^{a,C}
	4	30,95 ± 0,63 ^{b,A}	ND	23,71 ± 2,91 ^{b,BC}
	8	38,20 ± 0,84 ^{c,A}	ND	29,79 ± 2,57 ^{c,AB}
	12	40,00 ± 3,67 ^{d,A}	ND	32,36 ± 0,76 ^{c,A}
Alcalase® + US	0	14,45 ± 1,20 ^{a,B}	ND	63,06 ± 0,92 ^{d,A}
	2	54,05 ± 0,91 ^{b,D}	ND	22,32 ± 3,19 ^{a,D}
	4	59,15 ± 0,35 ^{c,C}	ND	26,39 ± 0,88 ^{a,C}
	8	66,30 ± 1,41 ^{d,C}	ND	38,03 ± 1,63 ^{b,C}
	12	68,45 ± 0,35 ^{d,C}	ND	43,62 ± 0,84 ^{c,E}
Neutrase® + US	0	14,45 ± 1,20 ^{a,B}	ND	63,06 ± 0,92 ^{e,A}
	2	49,45 ± 0,21 ^{b,C}	ND	10,39 ± 0,13 ^{a,AB}
	4	56,70 ± 0,42 ^{c,BC}	ND	23,18 ± 0,41 ^{b,BC}
	8	63,05 ± 1,20 ^{d,BC}	ND	31,87 ± 1,67 ^{c,B}
	12	67,10 ± 3,11 ^{d,BC}	ND	40,94 ± 1,43 ^{d,DE}
rTrypsin® + US	0	14,45 ± 1,20 ^{a,A}	ND	63,06 ± 0,92 ^{e,A}
	2	28,10 ± 0,70 ^{b,A}	ND	16,27 ± 2,90 ^{a,BC}
	4	32,90 ± 1,13 ^{c,A}	ND	24,86 ± 1,56 ^{b,C}
	8	38,15 ± 0,77 ^{d,A}	ND	32,30 ± 2,19 ^{c,B}
	12	39,90 ± 0,28 ^{d,A}	ND	39,21 ± 2,19 ^{d,CD}

^{A-E} Aynı harfler, aynı inkübasyon süresindeki farklı enzimlerle üretilmiş kazein hidrolizatlarının biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

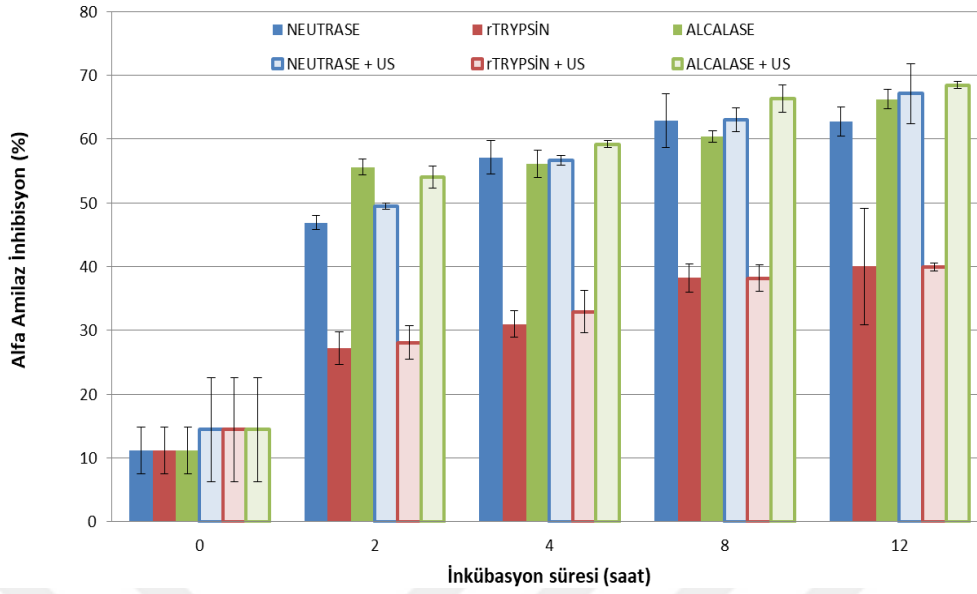
^{a-d} Aynı harfler, aynı enzim ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının inkübasyon süresince biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

US: Ultrases ön işleminin kazein hidrolizat üretiminde kullanımını temsil etmektedir.

¹ Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

² Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

³ Analiz sonucu 42,75 mg protein/mL için verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı enzimler ve ultrases önışlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyon yüzdelерinin inkübasyon süresi ile değışimi

Şekilde verilen Y eksen değeri % alfa amilaz inhibisyon sonuçlarını temsil ederken, X eksen (h) inkübasyon süresi olarak saati temsil etmektedir.

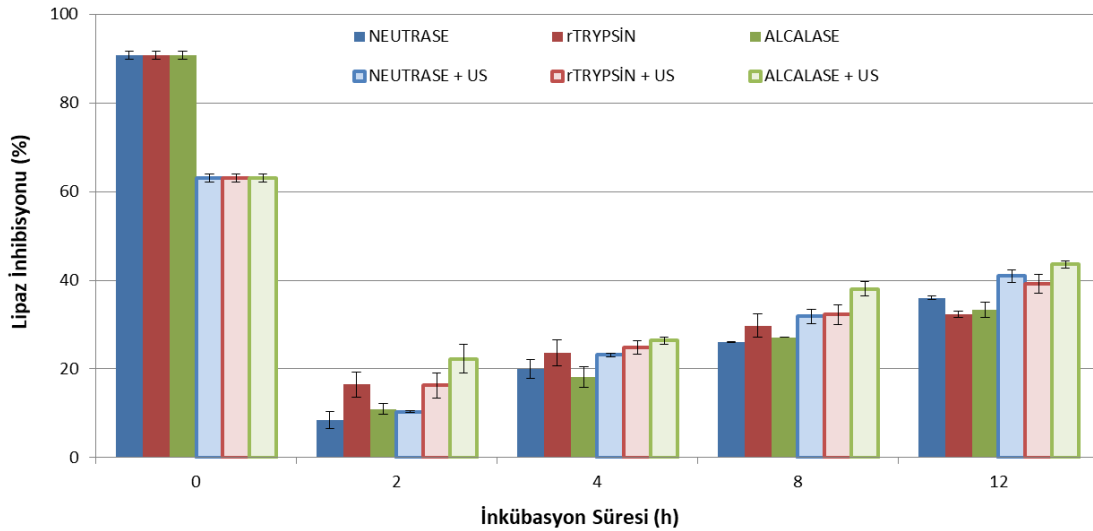
Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar incelendiğinde α -amilaz inhibisyon yüzdelерinin %11,2 ile %68,5 aralığında değışiklik görülmüştür. Tüm enzimler α -amilaz inhibisyonunu desteklemiştir. Enzimatik reaksiyonun uygulanma süresi ile saptanan inhibisyon aktivitesi de anlamlı düzeylerde artmıştır ($p < 0,05$). En yüksek aktivite değeri Alcalase® enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizle elde edilirken, onu Neutrase® enzimi ile üretilen hidrolizatlar yakından takip etmiştir. rTrypsin® enziminin kullanımı ile üretilen kazein hidrolizatlarında da α -amilaz inhibisyon aktivitesi artarken, bu artış diğer enzimlere göre oldukça düşük kalmıştır. Yapılan bir literatür çalışmasında Neutrase® ve Flavourzyme® enzimiyle 12 saatlik süre sonrasında elde edilen kazein peptit fraksiyonlarının biyoaktif özellikleri belirlenmiştir. Kazeinin Neutrase® enzimi sonrası α -amilaz inhibisyon yüzdesi % 67,0 belirlenirken, Flavourzyme® ile elde edilen hidrolizatların α -amilaz inhibisyon yüzdesi % 87,0 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda Neutrase® enzimi ile üretilen kazein hidrolizat örneklerinin değeriyle uyumluluk göstermektedir (Naji ve Çam, 2024). Diğer bir çalışmada, kazein hidrolizatının mikrobiyal proteaz enzimi ile hidrolize edilmesinin ardından 3 saatlik inkübasyon sonrası örneklerin α -amilaz yüzdesi %74,1 olarak belirlenirmiş ve 24 saatlik inkübasyon süresince yüzdelер arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Sonuçlar incelendiğinde

α -amilaz aktivite yüzdeleri çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunmaktadır. Çalışmanın 8. ve 12. saatleri arasındaki farklılıklar oldukça az bulunmuştur (Megrous ve diğerleri, 2020).

Ultrases ön işleminin bu biyoaktif özellik üzerindeki etkisi dalgalı olmakla beraber, genel olarak inhibisyonu destekler nitelikte bulunmuştur. Özellikle Alcalase® enzimi ile gerçekleştirilen inkübasyonun ilerleyen süreçlerinde, ultrases ön işlemi ile üretilmiş örneklerin daha yüksek α -amilaz inhibisyon aktivites gösterdiği görülmüştür ($p < 0,05$).

4.1.2.5. Lipaz İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Üretilen kazein hidrolizatı örneklerinin lipaz inhibisyon aktivitesi de incelenmiştir (Tablo 4.2 ve Şekil 4.6). Yapılan analizler sonucunda saptanan en yüksek inhibisyon değerleri kazein dispersiyonunda olmuştur (%90,8). Ultrases ön işlemi ile bu inhibisyon değeri azalmış (%63,1), yapılan 2 saatlik enzimatik reaksiyonla da önemli düzeyde inhibisyon aktivitesi kaybolmuştur (%8,5-22,3). 2 saatten sonra ise enzimatik reaksiyonla lipaz inhibisyon aktivitesinin önemli düzeylerde arttığı belirlense de ($p < 0,05$), başlangıçtaki kazein dispersiyonunun gösterdiği aktivite yakalanamamıştır (%43,6'ya ulaşmıştır). Yapılan bir çalışmada Neutrase® enzimi kullanılarak elde edilen kazein hidroliz fraksiyonunun en yüksek aktivite değerlerinin kontrol grubu örnekte olduğu gözlemlenmiştir (Naji ve Çam, 2024).



Şekil 4.6. Farklı enzimler ve ultrases ön işlem uygulaması ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının lipaz inhibisyon yüzdelerinin inkübasyon süresi ile değişimi

Şekilde verilen Y eksen değerleri % lipaz inhibisyon sonuçlarını temsil ederken, X eksen (h) inkübasyon süresi olarak saati temsil etmektedir.

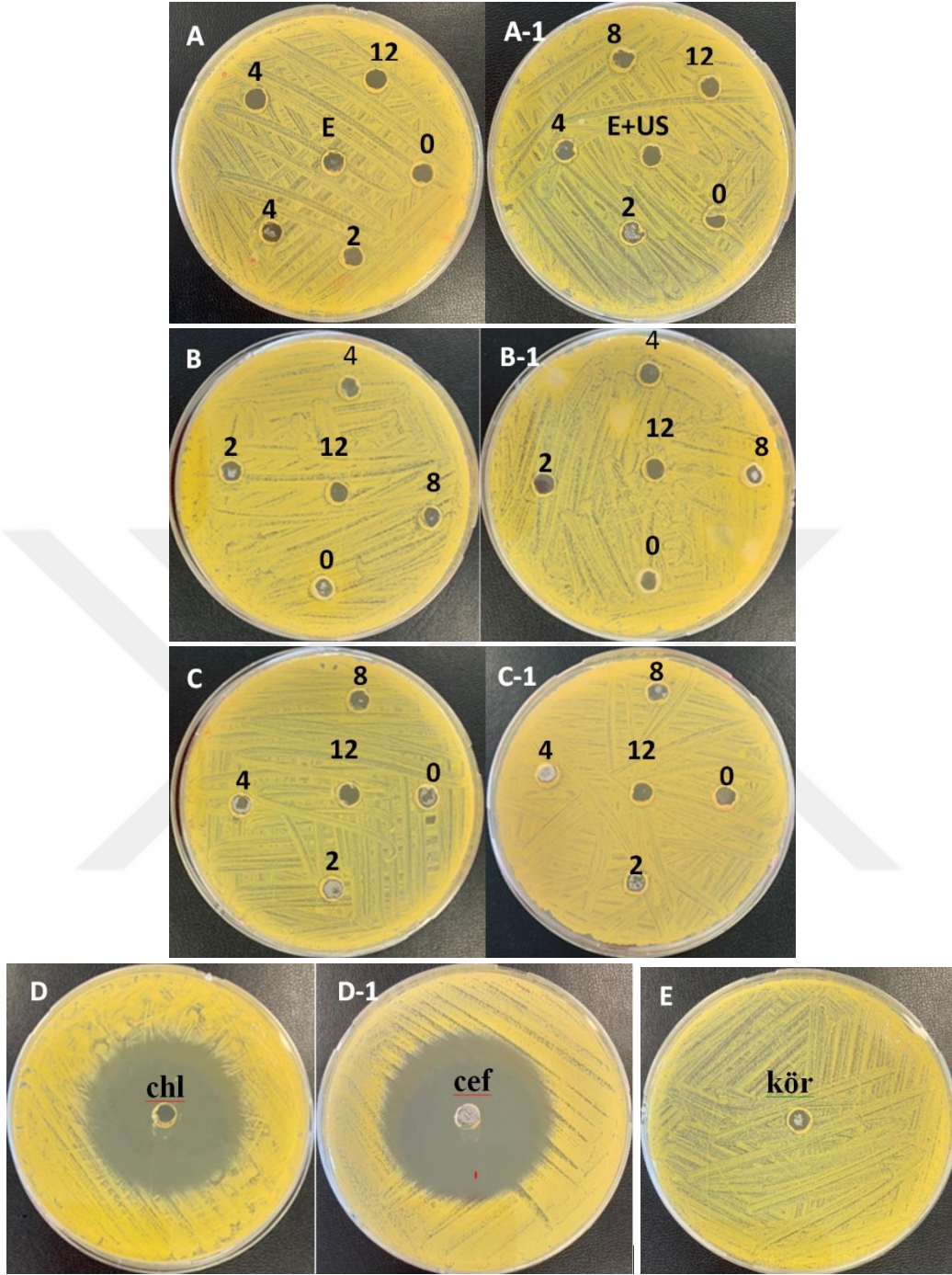
Çalışılan enzimler genel olarak yakın etkilerde sonuçlar yaratmıştır. Enzim çeşidinin yanı sıra lipaz inhibisyon aktivitesi üzerinde ultrases ön işleminin etkili olduğu görülmektedir. Bu aktivite için hemen hemen tüm örneklerde, ultrases ön işleminin istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.1.2.6. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

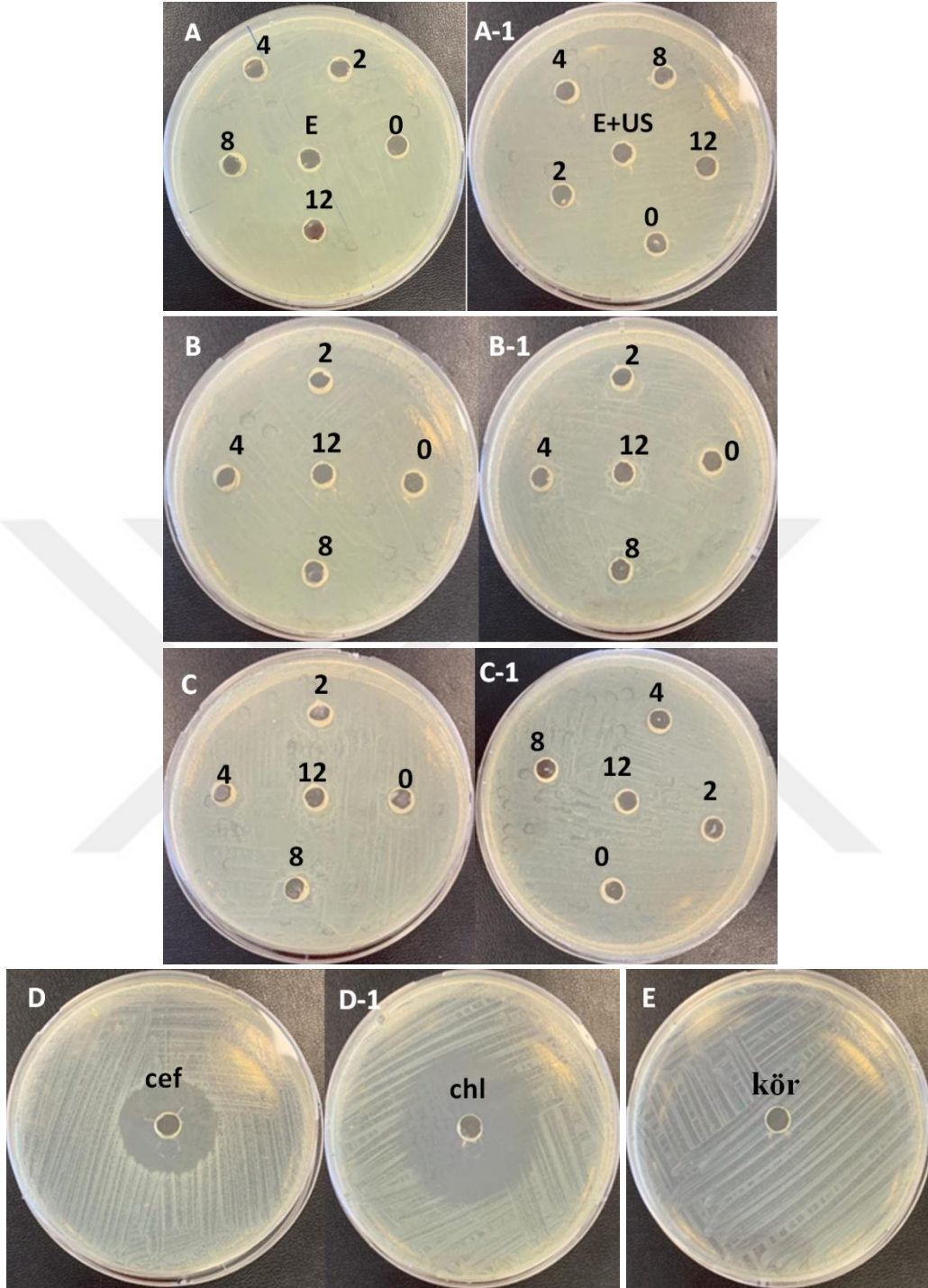
Kazein hidrolizatlarının *S. aureus* ATCC29213 ve *E. coli* K12 bakterileri üzerindeki etkileri incelenmiştir. *S. aureus* ATCC29213 üzerindeki etkilerini gösteren fotoğraflar Şekil 4.7’de verilmişken, *E. coli* ATCC25922 bakterisi üzerindeki etkileri gösteren fotoğraflar Şekil 4.8’de, ilgili şekillerdeki kodlamaların açıklamaları ise Tablo 4.3’te gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, hiçbir hidrolizatta incelenen bakteriler açısından antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır. Literatürde yapılan bir çalışmada, pepsin, tyripsin ve kimotripsin ile elde edilen kazein hidrolizatlarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Tyripsin ve diğer enzimler ile elde edilen hidrolizatların *E. coli* türlerine karşı anlamlı bir antimikrobiyal etki göstermediği gözlemlenmiştir (Théolier ve diğerleri, 2013). Diğer bir çalışmada, tyripsin enzimi kullanılarak elde edilen kazein hidrolizatının *S. aureus* türüne karşı antimikrobiyal etki göstermediği belirtilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde iki çalışmanın da bu çalışmayla uyumlu sonuçları rapor ettiği tespit edilmiştir (Mokhtari ve diğerleri, 2023).

Tablo 4. 3. Şekil 4.7’de ve Şekil 4.8’de verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri

Şekil	Kazein Hidrolizati	İnkübasyon Süresi (saat)
A	Alcalase®	0, 2, 4, 8, 12
A-1	Alcalase® + US	0, 2, 4, 8, 12
B	Neutrase®	0, 2, 4, 8, 12
B-1	Neutrase® + US	0, 2, 4, 8, 12
C	rTrypsin®	0, 2, 4, 8, 12
C-1	rTrypsin® + US	0, 2, 4, 8, 12
D	Pozitif Kontrol - Cefotaxime	-
D-1	Pozitif Kontrol - Chloramphenical	-
E	Negatif Kontrol - Tampon	kör



Şekil 4.7. Üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının *Staphylococcus aureus* ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi



Şekil 4.8. Üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının *Escherichia coli* ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi

4.1.3. Uygun Endopeptidazın ve İşlem Koşullarının Belirlenmesi

Yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatının üretilmesi için 3 farklı enzim ile 4 farklı inkübasyon süresinde, ultrases ön işlemi uygulanarak veya uygulanmayarak üretimler gerçekleştirilmiştir. Toplam 24 kazein hidrolizatının çeşitli biyoaktif özellikleri analiz edilmiştir ve genel anlamda en yüksek biyoaktif özelliklere sahip hidrolizatın seçilmesi hedeflenmiştir.

4.1.3.1. *TOPSİS (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution) Yöntemi*

Bu yöntem 1981 yılında Hwang ve Yoon tarafından geliştirilmiştir (Hwang ve diğerleri, 1981). Bu yöntemin avantajı kompleks algoritmalar ve karmaşık matematiksel modeller içermemesi ve uygulanmasındaki kolaylıklardır. Yöntemin özünde, en ideal (pozitif ideal) ve idealden en uzak değerlerin (negatif ideal) deneysel verilerden elde edilmiş sonuçlar matrisinden hareketle tanımlanması ve analiz edilen örneklerin bu pozitif ve negatif ideal noktalarına olan geometrik uzaklıklarının oranlarının değerlendirilmesi bulunmaktadır (Lopez, 2014; Karaman vd., 2014; (Himmetagaoglu ve diğerleri, 2018). TOPSIS yönteminin uygulanması ile tüm örnekler için bir “görelî yakınlık” değeri elde edilmektedir. Bu değer, 0 ile 1 arasında bir değerdir ve 1’e yakın olması tercih edilmektedir. Tez çalışmasının bu aşaması kapsamında üretilen örneklerin antihipertansif aktivite (ACE inhibisyon), antioksidan aktivite (serbest radikal bağlama, ABTS), antidiyabetik aktivite (α -amilaz inhibisyon) ve lipaz inhibisyon aktivitesi özellikleri maksimum olan örnek belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, biyoaktif peptit çalışmaları açısından özel önem taşıyan antihipertansif aktivite %40 ağırlıkla değerlendirilirken, diğer 3 biyoaktif özellik %20’şer ağırlıkla analize alınmıştır. Gerçekleştirilen TOPSIS analizi sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.4’te verilmiştir. Buradan hareketle en yüksek biyoaktif özelliklerin saptandığı örnek; 0,891 görelî yakınlık değeriyle, ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süresi ile Neutrase® enzimi kullanılarak üretilen örnek olmuştur. TOPSIS görelî yakınlık değerleri incelendiğinde, tüm örneklerde inkübasyon süresinin artışı ile görelî yakınlık değerlerinin arttığı görülmüştür. Bu anlamda, hidroliz düzeyi biyoaktiviteyi genel anlamda olumlu etkilemektedir.

Tablo 4.4. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen göreceli yakınlık değerleri

Enzimler*	İnkübasyon süresi (saat)	Biyoaktif Özellikler				TOPSIS C**
		ACE İnhibisyon (%)	ABTS Katyon Radikal Bağlama(μ mol troloks/g örnek)	α -Amilaz İnhibisyon (%)	Lipaz İnhibisyon (%)	
Neutrase®	2	67,44	561,29	46,90	8,50	0,424
	4	78,26	624,96	57,13	19,98	0,628
	8	83,59	646,12	62,91	26,01	0,733
	12	84,17	658,44	62,77	36,05	0,865
rTrypsin®	2	36,51	489,84	27,21	16,46	0,124
	4	38,53	544,13	30,99	23,71	0,238
	8	49,17	550,97	38,21	29,79	0,393
	12	53,52	564,47	40,00	32,36	0,463
Alcalase®	2	48,94	542,18	55,57	10,99	0,290
	4	58,92	603,93	56,06	18,22	0,440
	8	63,99	657,89	60,34	27,16	0,593
	12	68,96	696,06	66,21	33,37	0,722
Neutrase® + US	2	65,95	571,85	49,46	10,39	0,428
	4	75,97	628,54	56,69	23,18	0,646
	8	79,08	655,69	63,05	31,87	0,788
	12	77,59	686,86	67,11	40,94	0,891
rTrypsin® + US	2	37,23	507,89	28,09	16,27	0,124
	4	42,71	558,46	32,92	24,86	0,278
	8	54,47	561,99	38,19	32,30	0,466
	12	59,02	572,51	39,92	39,21	0,570
Alcalase® + US	2	53,21	554,43	54,02	22,32	0,406
	4	57,55	627,57	59,19	26,39	0,513
	8	65,19	675,77	66,33	38,03	0,715
	12	64,86	715,93	68,46	43,62	0,742

* US: ultrases ön işlemi uygulanarak üretilen örnekler.

** TOPSIS göreceli yakınlık (C) değeri.

TOPSIS sonuçlarından hareketle, en yüksek göreceli yakınlık değerine sahip örneklerden üçü seçilmiştir. Seçilen üç örneğin tamamı 12 saatlik inkübasyon süresine sahip olan örneklerdir. Bu örnekler, Neutrase®-US, Alcalase®-US ve Neutrase® (US ön işlemi yapılmayan) şeklinde

kodlanmış hidrolizatlardır. Seçilen bu örneklerin antimikrobiyal aktivite potansiyelleri ayrıca değerlendirilmiştir.

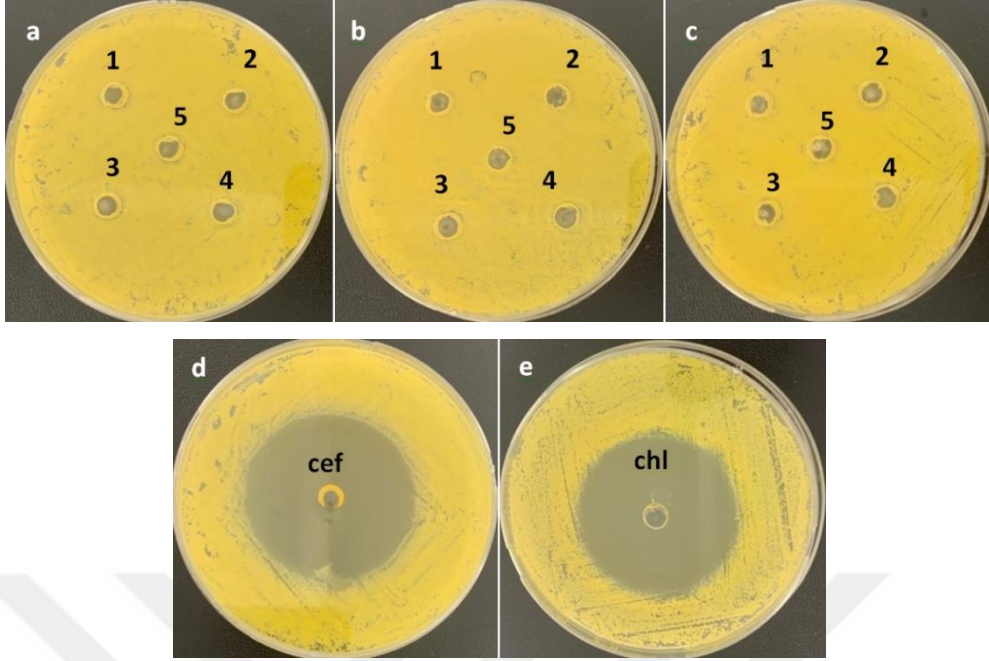
4.1.3.2. Antimikrobiyal Aktivite

Üretilen hidrolizatlarda antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır, ancak, bunun nedeninin üretilen hidrolizatların yeterince konsantre olmaması olabileceği düşünülerek, bu üç örnek liyofilize edilerek tekrar antimikrobiyal aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek biyoaktivite gösteren üç örneğin liyofilize edilmiş halleri dört farklı konsantrasyonda analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları Şekil 4.9'da ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekilde belirtilen örneklerin ve konsantrasyonlarının açıklamaları ise Tablo 4. 5'te belirtilmiştir.

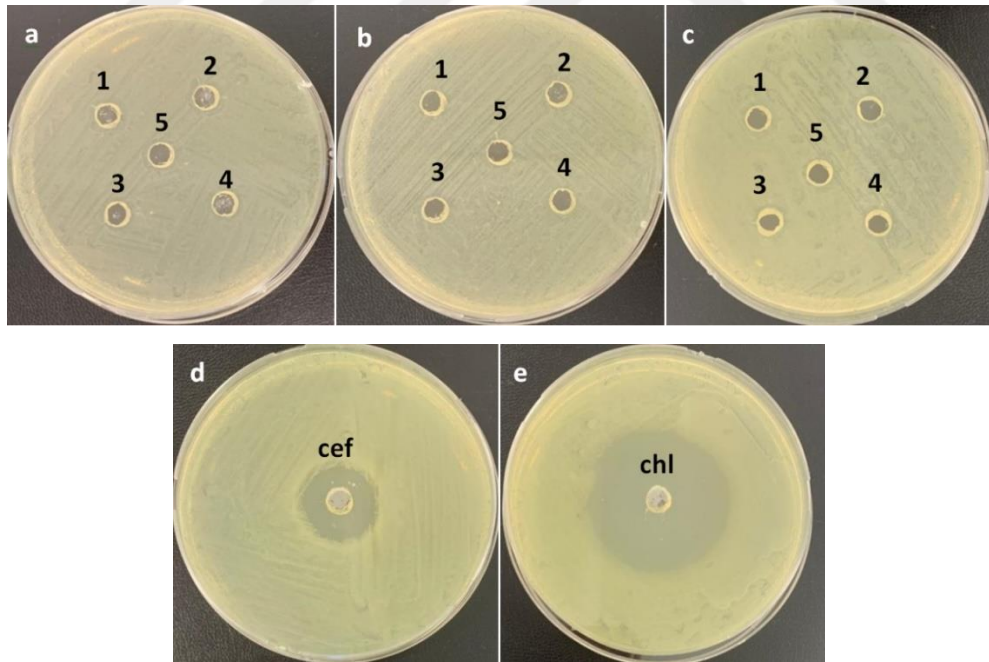
Kazein hidrolizatlarının antimikrobiyal aktivite özelliklerine dair literatürde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Deve sütü kazeininin farklı enzimlerle (Alcalase®, Papain, Chymotrypsin) hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatların dört farklı mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etkisi kuyucuk yayılım yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Hidrolizatların *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı zone alanları oluşturduğu belirtilmiştir (Kumar ve diğerleri, 2016). Ayrıca, kazein hidrolizatının hidroliz süresiyle antimikrobiyal aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmada dört farklı mikroorganizma türü çalışılmıştır ve sonuç olarak kazein hidrolizatının *E. coli* ATCC922 türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi tespit edilememiştir (Bougherra ve diğerleri, 2017). Ek olarak, sığır α_{s1} -kazeinin pepsin, rTrypsin®, a-chymotrypsin ve b-chymotrypsin enzimleriyle üretilen peptit fraksiyonlarının Gram(+) ve Gram(-) mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Mikroorganizmalar içerisinde *E.coli* türüne karşı hidrolizatların antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (McCann ve diğerleri, 2006). Tez çalışması kapsamında üretilen kazein hidrolizatların 20 mg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarında ise *E. coli* ATCC25922 ve *S. aureus* ATCC29213 mikroorganizmalarına karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır.

Tablo 4.5. Şekil 4.9’da ve Şekil 4.10’da verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri

Şekil	Enzim/Antibiyotik	Örnek No	Örnek Konsantrasyonu (mg/mL)
a	Alcalase® + US	1	20
		2	4
		3	0,8
		4	0,016
		5	Kör (saf su)
b	Neutrase® + US	1	20
		2	4
		3	0,8
		4	0,016
		5	Kör (saf su)
c	Neutrase®	1	20
		2	4
		3	0,8
		4	0,016
		5	Kör (saf su)
d	Cefotaxime		25-50
e	Chloramfenicol		0,25-0,5



Şekil 4.9. Yüksek biyoaktiviteye sahip farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (Alcalase®+US, Neutrase®+US ve Neutrase®) *Staphylococcus aureus* ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi



Şekil 4.10. Yüksek biyoaktiviteye sahip farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (Alcalase®+US, Neutrase®+US ve Neutrase®) *Escherichia coli* ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi

4.2. Kazein Hidrolizatı Üretiminde Ekzopeptidaz Kullanımının Etkisinin Belirlenmesi

En uygun endopeptidaz çeşidi belirlendikten sonra, elde edilen hidrolizatın biyoaktivitesini geliştirmek üzere endopeptidaz ile birlikte ekzopeptidaz kullanımının etkisi incelenmiştir. İki farklı ekzopeptidaz enzimi (Flavourzyme® ve Protana™ Prime), tek tek ve birlikte kullanılmış ve en yüksek biyoaktivite gösteren örnek belirlenmiştir. Bu doğrultuda üretilen hidrolizatların analizleri de gerçekleştirilmiş ve en yüksek biyoaktiviteye sahip olan örnek TOPSIS ile belirlenmiştir. Seçilen ticari ekzopeptidaz enzimleri sıklıkla acılık giderici etkileriyle, endopeptidaz uygulaması sonrası kullanılan ve lezzet gelişimini destekleyen enzimlerdir. Bunlardan Flavourzyme® 1000 L (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) aminopeptidaz grubu bir enzimken (1100 LAPU/g), Protana™ Prime (Novozymes, Bagsvaerd, Danimarka) hem aminopeptidaz (970 LAPU/g), hem de karboksipeptidaz (890 CPDU-A/g) etkinliği gösteren bir enzimdir. Protein hidrolizat işlemlerinde endopeptidaz ve ekzopeptidazların farklı görevleri vardır. Endopeptidazlar, peptit zincirindeki peptit bağlarını kırarak büyük parçadaki peptitlerin üretilmesine katkı sağlarken, ekzopeptidaz enzimleri zincir sonundaki peptit bağlarını kırarak dipeptit ve serbest aminoasitlerin oluşumlarını sağlamaktadır (Rawlings ve Salvesen, 2013). Endopeptidaz ve ekzopeptidazlarla ya da her ikisi ile yapılan hidroliz işlemi fonksiyonel özellikler, yüksek besin değerlerine sahip sağlıklı ürünler ve istenen duyu özellikleri gibi istenen özelliklere sahip çeşitli ürünler üretmek için en yaygın kullanılan ve etkili işlemlerden biridir.

4.2.1. Biyoaktivite Özelliklerinin Değişimi

Üretilen hidrolizatların toplam peptit miktarları ve çeşitli biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Bu kapsamda incelenen antimikrobiyal aktivite analizlerinin sonuçları bir sonraki alt başlıkta incelenirken, toplam peptit miktarı, antihipertansif aktivite (ACE inhibisyon aktivitesi) ve antioksidan aktivite (ABTS katyon radikal ve metal bağlama aktivitesi) analiz sonuçları Tablo 4.6'da, antidiyabetik aktivite (α -amilaz ve α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi) ve lipaz inhibisyon aktivitesi analiz sonuçları Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Bu kapsamda incelenen özelliklerin grafiksel gösterimi de Şekil 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarları, antihipertansif ve antioksidan aktivite sonuçları

Enzim*	Süre (Saat)	Toplam Peptit Miktarı (mg Trypton/g örnek)	ACE İnhibisyon Aktivite (%) ¹	ABTS Katyon Radikali Bağlama Kapasitesi (μmol troloks/mL örnek)	Metal Bağlama (%) ²
N	12	219,00 ± 7,18 ^b	40,00 ± 1,13 ^a	523,94 ± 9,91 ^b	40,32 ± 1,40 ^d
NP	12	345,96 ± 6,14 ^c	40,70 ± 0,98 ^a	556,60 ± 8,36 ^c	33,60 ± 1,61 ^c
NF	12	358,03 ± 9,13 ^d	52,80 ± 0,84 ^b	579,82 ± 12,25 ^d	31,60 ± 0,87 ^b
NFP	12	447,21 ± 7,61 ^e	50,55 ± 0,91 ^b	622,34 ± 16,52 ^e	34,17 ± 0,85 ^c
Kontrol	0	100,26 ± 5,91 ^a	ND	441,00 ± 10,40 ^a	29,05 ± 0,49 ^a

^{a-c} Aynı harfler, farklı enzim kombinasyonları ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

* Tüm örnekler ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime ; NF: Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime .

¹ Analiz sonucu 5,700 mg protein / mL için verilmiştir.

² Analiz sonucu 0,043 mg protein / mL için verilmiştir.

Tablo 4.7. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri sonuçları

Enzim*	Süre (Saat)	α-Amilaz İnhibisyon Aktivite (%) ¹	α-Glukosidaz İnhibisyon Aktivite(%) ²	Lipaz İnhibisyon Aktivite (%) ³
N	12	62,65 ± 0,35 ^b	5,05 ± 1,06 ^{ab}	41,35 ± 2,33 ^a
NP	12	81,90 ± 0,14 ^c	4,75 ± 0,35 ^a	41,80 ± 2,40 ^a
NF	12	81,30 ± 0,56 ^c	6,50 ± 0,14 ^b	38,90 ± 0,70 ^a
NFP	12	92,70 ± 1,55 ^d	6,05 ± 0,35 ^{ab}	40,45 ± 2,19 ^a
Kontrol	0	24,45 ± 1,48 ^a	ND	58,90 ± 3,39 ^b

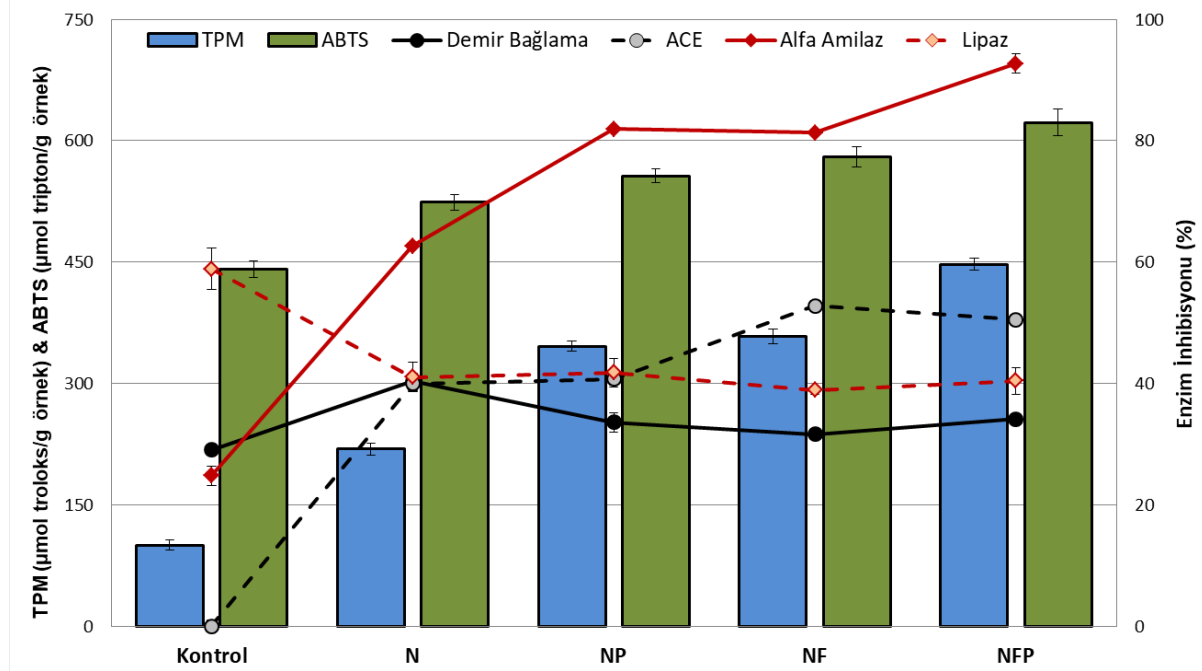
^{a-d} Aynı harfler, farklı enzim kombinasyonları ile üretilmiş olan kazein hidrolizatlarının biyoaktivite özellikleri arasındaki farkın önemli olmadığını gösterir (p>0,05).

* Tüm örnekler ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime ; NF: Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime .

¹ Analiz sonucu 85,50 mg protein / mL için verilmiştir.

² Analiz sonucu 85,50 mg protein / mL için verilmiştir.

³ Analiz sonucu 42,75 mg protein / mL için verilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı ekzopeptidaz kombinasyonlarının da hidrolizde kullanılması ile üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarı ile farklı biyoaktif özellikleri. Tüm örnekler ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime; NF: Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime.

Ekzopeptidaz enzimleri içerisinde Flavourzyme®'ın etkisinin Protana™ Prime 'a göre biraz daha fazla olduğu görülmüş ve her iki enzimin birlikte kullanımı ile hidroliz düzeyinin daha da arttığı belirlenmiştir.

Ekzopeptidaz uygulamasının kazein hidrolizatlarının hidroliz düzeyleri üzerine gösterdiği etkiye çok benzer bir değişim ABTS analizi sonucunda da elde edilmiştir. Ekzopeptidaz ilavesi ile örneklerin ABTS radikalini bağlama kapasitesi artmış ve bu artışta Flavourzyme®'ın etkisinin Protana™ Prime 'a göre biraz daha yüksek olduğu, her iki enzimin birlikte kullanımı ile antioksidan kapasitenin daha da arttığı belirlenmiştir. Demir bağlama analizi açısından ise durum farklıdır. Endopeptidaz ilavesi ile artan metal bağlama değerleri, ekzopeptidaz ilavesi ile istatistiksel olarak önemli bir miktarda azalmıştır.

Ekzopeptidaz ilavesinin antihipertansif etkisi incelendiğinde ise, Protana™ Prime enziminin ilavesinin ACE enzim inhibisyonuna anlamlı bir katkı sağlamadığı görülmektedir. Antihipertansif aktivite açısından N ile NP örnekleri ve NF ile NFP örnekleri istatistiksel olarak

farksız olarak hesaplanmıştır ($p>0,05$). Buna karşın, Flavourzyme® enzimi ile üretilen hidrolizatlarda antihipertansif aktivite açısından belirgin artış görülmüştür ($p<0,05$).

Antidiyabetik aktivite açısından değerlendirildiğinde, ekzopeptidaz uygulamasının α -amilaz inhibisyonunu anlamlı düzeyde geliştirdiği görülmüştür ($p<0,05$). Kullanılan ekzopeptidaz türünün farklılığı α -amilaz inhibisyon aktivitesini anlamlı düzeyde etkilememiş ($p>0,05$), birlikte kullanımları ile ise inhibisyon aktivitesi daha da artmıştır ($p<0,05$). Bir diğer antidiyabetik aktivite belirteci olan α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi açısından ise belirli dalgalanmalar görünse de belirlenen değerler oldukça küçük ve değişimler kararsız bulunmuştur.

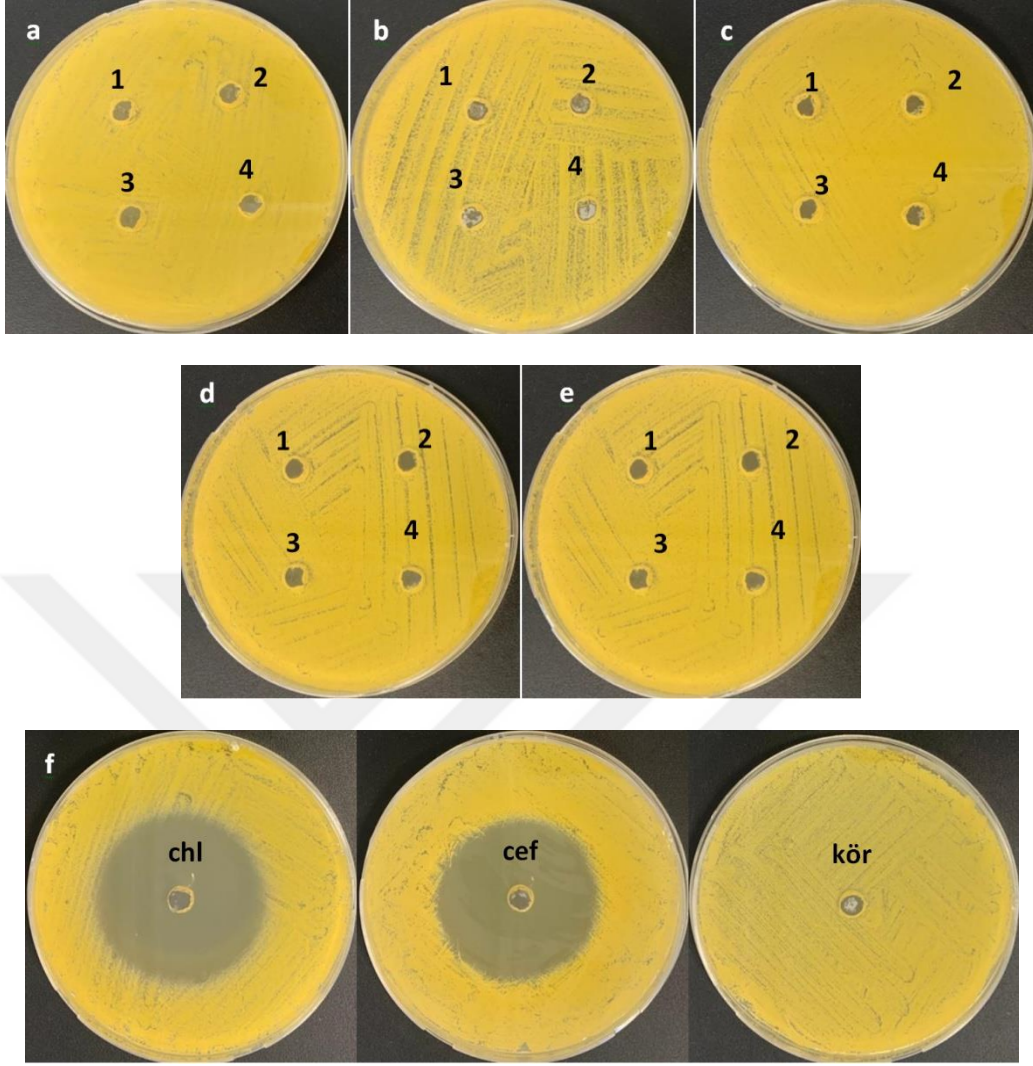
Lipaz inhibisyon aktivitesi açısından ise tez çalışmasının ilk aşamasında belirlendiği gibi, kazein dispersiyonu ile yüksek inhibisyon aktivitesi saptanırken, endopeptidaz ilavesi ile bu aktivite istatistiksel olarak önemli düzeyde düşmüştür ($p<0,05$). Buna karşın, ilave edilen ekzopeptidaz enzimlerinin aktivite üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı görülmüştür. Benzer bir sonuç, literatürdeki bir çalışmada da belirtilmiştir; bu çalışmada, farklı süt türlerinden Flavourzyme ve Neutrase enzimleri ile elde edilen hidrolizatların lipaz inhibisyon aktivite değerlerinin, enzim eklenmeyen örneklerle karşılaştırıldığında daha düşük inhibisyon aktivite değerleri gösterdiği gözlemlenmiştir (Naji ve Çam, 2024). Literatürde, kazeinlerin ve hidrolizatlarının lipaz inhibisyon aktivitelerini karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, mevcut çalışmanın aksine, inek kazeininin Alcalase ve Pronase E ile işlenmesinin lipaz inhibisyon aktivitesinde artış sağladığı belirtilmiştir. Bu farkın, enzimlerin farklı mekanizmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.2. Antimikrobiyal Potansiyelinin Değişimi

Neutrase® enzimi ile beraber farklı ekzopeptidazların tek tek ve birlikte kullanımıyla elde edilen kazein hidrolizatlarının antimikrobiyal aktivitesi kuyucuk yayılım yöntemiyle analiz edilmiştir. Daha önceki çalıştığımız aşamada, kazein hidrolizatları doğrudan kullanılmış (herhangi bir konsantrasyon işlemi yapılmadan), kuyucuk yayılım yöntemiyle çalışılmış ve sonuç alınamamıştır. Bu durumun peptit konsantrasyonunun yetersizliğinden kaynaklanmış olabileceği düşünüldüğünden, örnekler liyofilize edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda analiz tekrarlanmıştır. Çalışmanın bu aşamasında da, incelenecek olan hidrolizatlar önce liyofilize edilmiş, sonrasında farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek analiz edilmiştir. Yapılan analizler

sonucunda üretilmiş hiçbir hidrolizatta incelenen bakterilere yönelik bir antimikrobiyal aktivite tespit edilememiştir. Literatürde yapılan bir çalışmada kazein proteinlerinin Alcalase, Neutrase, Protamex ve Flavourzyme® enzimi ile hidrolizasyonu sonrasında elde edilen ürünlerin antimikrobiyal potansiyellerini belirlemişlerdir (Kim ve diğerleri, 2021). Verilen sonuçlara göre hidrolizatların *Staphylococcus aureus* türlerine ve *E. coli* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Mokhtari ve diğerleri, 2023). Sonuçlar doğrultusunda *S. aureus* türlerine ve *E. coli* türlerine karşı olan antimikrobiyal aktivite sonuçları bu çalışma ile uyumlu bulunmamıştır. Bunun nedeni olarak hidroliz üretim, analiz koşullarının ve süt bileşimlerinin farklılıklarından kaynaklandığını belirtilmektedir.

Üretilen kazein hidrolizatlarının *S. aureus* ATCC29213 bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi için yapılan analiz sonucu Şekil 4.12’de, *E. coli* ATCC25922 bakterileri ile yapılan analiz sonucu ise Şekil 4.13’te verilmiştir. Tablo 4.8’de ise kullanılan kodlamalarla ilgili bilgiler verilmiştir.



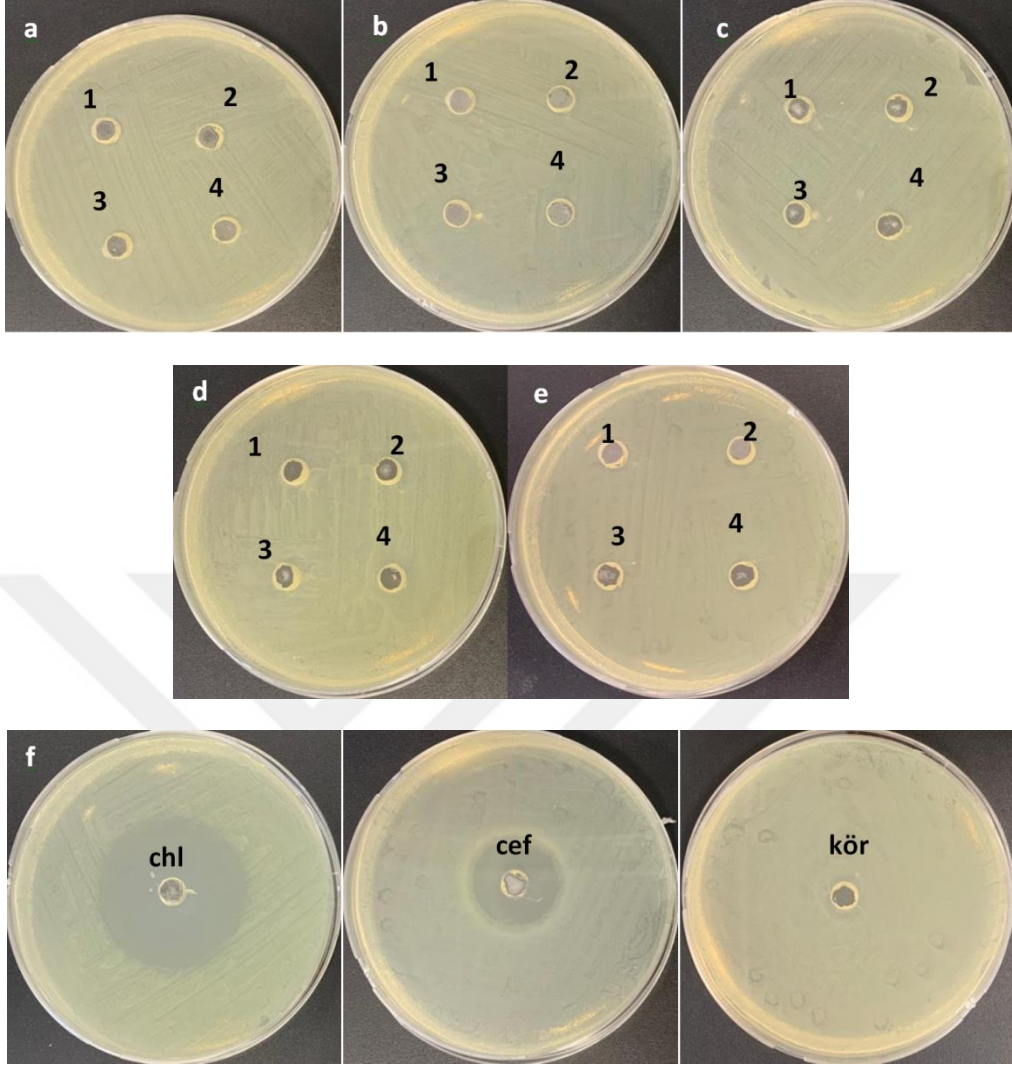
Şekil 4.12. Ekzopeptidaz enzimlerinin de kullanımı ile üretilen farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizati örneklerinin (N, NP, NF ve NFP) *S. aureus* ATCC29213 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi

Süt ve süt ürünlerinden elde edilen peptitlerin *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediğini belirlemiştir (Akbal ve Öner, 2021). Benzer şekilde, otlu peynir ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC 11303'e karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir (Kara ve Köse, 2020). Bu sonuçlar, bazı peptitlerin veya bitkisel ekstraktların *S. aureus* üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğini ve bu tür mikroorganizmalara karşı etkinliklerinin değişkenlik gösterebileceğini ortaya çıkarmaktadır.

Tablo 4.8. Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de verilen antimikrobiyal aktivite kodlarının temsil ettiği örnek bilgileri

Şekil	Enzim/Antibiyotik*	Örnek No	Örnek konsantrasyonu (µg/mL)
A	Kontrol	1	4
		2	0,4
		3	0,04
		4	0,004
b	N	1	4
		2	0,4
		3	0,04
		4	0,004
c	NP	1	4
		2	0,4
		3	0,04
		4	0,004
d	NF	1	4
		2	0,4
		3	0,04
		4	0,004
e	NFP	1	4
		2	0,4
		3	0,04
		4	0,004
f	Cefotaxime		25-50
	Chloramfenicol		0,25-0,5
	Kör		

* Tüm örnekler ultrases ön işlemi uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime ; NF: Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime .



Şekil 4.13. Ekzopeptidaz enzimlerinin de kullanımı ile üretilen farklı konsantrasyonlardaki kazein hidrolizatı örneklerinin (N, NP, NF ve NFP) *Escherichia coli* ATCC25922 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi

4.2.3. Uygun Enzim Kombinasyonunun Belirlenmesi

Ultrases ön işlemleri uygulanarak 12 saatlik inkübasyon ile elde edilen kazein hidrolizatlarının biyoaktivite özelliklerini değerlendirmek için çok kriterli karar verme yöntemi olarak TOPSİS kullanılmıştır. Uygulamada kullanılan kriterler, bir önceki aşama olarak değerlendirilen uygun endopeptidazın belirlenmesinde kullanılan kriterler olarak seçilmiştir.

Bu adımda, üretilen hidrolizat örneklerinin antihipertansif, antioksidan ve lipaz inhibisyon aktiviteleri değerlendirilerek en yüksek biyoaktiviteye sahip hidrolizat örneğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Biyoaktivite özellikleri açısından antihipertansif aktivite %40 ağırlıkta, diğer üç

biyoaktif özellikler ise %20 ağırlıkta değerlendirilmiştir. Kullanılan TOPSIS ile her bir kazein hidrolizat örneği için bir “görelî yakınlık” değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerlerin sonuçlarının 0 ile 1 arasında olması beklenmekte ve 1’e yakın olması tercih edilmektedir. Yapılan hesaplama sonuçları Tablo 4.9’da sunulmuştur. Biyoaktivite değerleri ve TOPSIS sonuçları değerlendirildiğinde Protana™ Prime ve Flavourzyme® enzimlerinin bir sonraki aşama olarak değerlendirilen optimizasyon uygulamasında parametre olarak kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Tablo 4.9. TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen görelî yakınlık değerleri

Enzimler*	İnkübasyon süresi (saat)	Biyoaktif Özellikler				TOPSIS C**
		ACE İnhibisyon (%)	ABTS (µmol troloks/g örnek)	α-Amilaz İnhibisyon (%)	Lipaz İnhibisyon (%)	
N	12	40,02	523,94	62,66	41,04	0,071
NP	12	40,70	556,61	81,91	41,77	0,319
NF	12	52,79	579,80	81,30	38,90	0,775
NFP	12	50,53	622,34	92,73	40,44	0,857

* Tüm örnekler ultrases ön işlemleri uygulanarak, 12 saatlik inkübasyon süreci ile üretilmiştir. N: Neutrase®; NP: Neutrase® + Protana™ Prime ; NF: Neutrase® + Flavourzyme®; NFP: Neutrase® + Flavourzyme® + Protana™ Prime .

** TOPSIS görelî yakınlık (C) değeri.

4.3. Yüksek Biyoaktiviteye Sahip Kazein Hidrolizatı Üretim Optimizasyonu ve İşlem Koşullarının Biyoaktivite Üzerine Etkileri

Bu aşamada 10 dakikalık sürekli uygulanan ultrases ön işlemleri uygulaması sonrası Neutrase® enziminin (%1,25 kazein bazında) ilavesi ile 12 saatlik inkübasyonla üretilen örneklerin diğerlerinden daha yüksek biyoaktivite gösterdikleri ortaya konulmuştur. Daha sonrasında, endopeptidaz enzimi ile eşzamanlı olarak ekzopeptidaz enzimlerinin kullanımının hidrolizat biyoaktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve ekzopeptidaz ilavesinin biyoaktiviteyi olumlu etkilediği ortaya konulmuştur. Bu aşama sonunda, 10 dakikalık sürekli uygulanan ultrases ön işlemleri uygulaması sonrası Neutrase®, Flavourzyme® ve Protana™ Prime (sırasıyla %1,25, %0,25 ve %0,25 kazein bazında) ilavesi ile 12 saatlik inkübasyonla üretilen örneklerin diğerlerinden daha yüksek biyoaktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu noktadan sonra,

kazein hidrolizatlarının biyoaktivitesini arttırmaya yönelik son bir aşama olarak, işlem koşullarının optimizasyonu hedeflenmiştir ve optimizasyon üretimleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Optimizasyon Faktörlerinin, Düzeylerinin ve Deneme Planının Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında endopeptidaz konsantrasyonunun da ön denemeler kapsamında denenmiş ve inkübasyon süresi ile ilişkilendirilmiş olmasından ötürü kullanılacak Neutrase® konsantrasyonu substrat (kazein) bazında %1,25 olarak sabitlenmiştir. Ancak, önceki aşamalarda ekzopeptidaz konsantrasyonu hiç denenmemiş olduğundan, endopeptidaz konsantrasyonunun optimizasyonda bir faktör olarak kullanılması düşünülmüştür. Önceki aşamada ekzopeptidaz varlığının sonuçları önemli düzeylerde etkilemiş olması, bu değişkenin faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu doğrultuda, Flavourzyme® ve Protana™ Prime enzimlerinin eşit düzeylerde kullanıldığı ve konsantrasyonlarının %0 ile %1,0 aralığında değiştirildiği bir deneme planının oluşturulması hedeflenmiştir.

Formülasyondaki ekzopeptidaz konsantrasyonunun yanı sıra, enzimatik reaksiyonlardaki en önemli faktörlerden birisi olan inkübasyon süresi de faktör olarak optimizasyona dahil edilmiştir. Tez çalışmalarının önceki aşamalarında 12 saatlik işlem süresinin uygun olduğu belirlenmiştir, ancak bu süre o aşamalarda çalışılan en uzun inkübasyon süresi olduğundan, daha uzun inkübasyon sürelerinde biyoaktivitenin daha da yükselebileceği öngörülmüştür. Bu doğrultuda inkübasyon süresinin yanıt olarak alınması ve 10-20 saat aralığının denemelerde kullanılması kararlaştırılmıştır.

Son olarak, tez çalışmasında önem verilen ve her aşamada denenilen ultrases işleminin etkisi de optimizasyona dâhil edilmiştir. Önceki aşamalarda, ultrases işleminin çok yüksek olmasa da anlamlı düzeylerde etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu etkinin genel anlamda biyoaktiviteyi olumlu etkilediği ortaya konulmuş ve 10 dakikalık sürekli gerçekleştirilen bir ön işlemle olumlu sonuçlar alındığı saptanmıştır. Bu doğrultuda, ultrases işleminin şiddetini daha da arttırmaya yönelik bir deneme planının ortaya çıkartılması planlanmıştır. Bu kapsamda yapılan ön denemelerde ise, 10 dakikadan daha uzun süreli gerçekleştirilen ön işlemlerde, kullanılan kazein çözeltisinin sıcaklığının kontrol edilemez şekilde yükseldiği görülmüştür. Önceki aşamalardaki ultrases uygulamalarında, 50 mL'lik falkon tüplerine konulan kazein çözeltileri kırık buz içerisine gömülmüş şekilde ultrases işlemine maruz bırakılmış ve 10 dakikada (TS 103 probu ile maksimum genlik olan %65 genlikte) 50 °C'nin aşılması bu şekilde

sağlanmıştı. Ancak, bu sürenin üzerine çıkıldığında sıcaklığın ciddi artmış olduğu görüldüğünden, ultrases işleminin kesikli olarak gerçekleştirilmesi denenmiştir. Kesikli işlemde, sistemin 1 saniye çalışıp, 1 saniye durması ayarlanmış ve bu şekilde 30 dakikalık işlemde bile sıcaklığın 50 °C'yi aşmadığı görülmüştür. Daha yüksek bir ultrases enerjisinin substrata aktarılabilmiş olması göz önüne alınarak, optimizasyon aşamasında ultrases ön işleminin kesikli şekilde uygulanması planlanmıştır. Ultrases işleminin maksimum genlikte (%65) ve 0-30 dakika aralığında uygulanmasına karar verilmiştir.

4.3.2. Optimizasyon Analiz Sonuçları ve Modelleme

Optimizasyon amacıyla CCRD deneme tasarımına göre üretilen 20 kazein hidrolizatı örneğinin TPM değeri ile 6 farklı biyoaktif özelliği (serbest radikal süpürme kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, ACE inhibisyonu, α -amilaz inhibisyonu, α -glukosidaz inhibisyonu ve lipaz inhibisyonu) analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen değerler Tablo 4. 10'da sunulmuştur.

Tablo 4.10. Optimizasyon amacıyla üretilen kazein hidrolizatlarının analiz sonuçları

Üretim No	TPM ¹	Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi ²	Metal bağlama Kapasitesi (%) ³	ACE İnhibisyonu (%) ⁴	α -Amilaz İnhibisyonu (%) ⁵	α -Glukosidaz İnhibisyonu (%) ⁶	Lipaz İnhibisyonu (%) ⁷
1	459,9	617,5	24,7	49,6	68,5	3,7	10,2
2	523,8	614,4	18,1	43,5	61,3	4,3	6,4
3	467,2	688,5	18,7	48,7	67,8	4,8	15,1
4	4624	627,5	25,1	49,2	74,4	3,2	11,8
5	490,4	637,9	27,1	48,0	64,5	3,7	9,2
6	216,6	581,2	29,7	45,8	-23,1	3,6	16,3
7	580,0	606,4	34,0	49,8	70,4	4,9	9,6
8	569,1	647,0	26,5	51,9	70,0	5,8	13,6
9	487,5	631,8	24,3	49,0	63,8	3,1	10,6
10	529,9	623,3	14,7	49,8	67,5	6,0	10,8
11	405,2	674,7	24,9	50,2	46,1	4,3	12,6
12	509,4	603,6	19,7	49,8	63,1	5,2	7,6
13	552,4	551,2	24,3	41,8	55,4	2,7	10,0
14	389,8	619,1	26,0	47,8	47,2	4,3	8,3
15	502,3	630,6	25,7	46,8	71,4	3,3	10,4
16	529,7	614,7	30,2	53,6	66,3	5,8	10,4
17	418,0	593,9	25,7	53,0	42,9	5,9	7,4
18	546,3	575,6	24,0	47,7	52,7	3,7	6,6
19	494,8	647,5	24,8	49,4	65,3	3,8	10,2
20	423,8	645,5	33,5	52,1	48,1	5,3	10,8

¹ TPM: Toplam Peptit Miktarı, mg Tripton/g örnek olarak verilmiştir.

² Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi, μ mol troloks/mL örnek olarak verilmiştir.

³ Analiz sonucu 0,043 mg protein/mL için verilmiştir.

⁴ Analiz sonucu 5,700 mg protein/mL için verilmiştir.

⁵ Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁶ Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁷ Analiz sonucu 42,75 mg protein/mL için verilmiştir.

Yapılan analizler sonrası tüm yanıtlar istatistiksel analize tabi tutulmuş ve faktörlerle ilişkisi incelenmiş, istatistiksel olarak önemli faktörlerle deneysel sonuçların değişimini açıklayan denklemler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, elde edilen veriler çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için faktörlere bağlı ikinci dereceden polinomiyal denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu analiz ile her bir faktörün yanıtlar üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerinin önemi %95’lik F-testi (Fischer testi) uygulanarak belirlenmiş, istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelin dışında bırakılmıştır. Elde edilen

modelin deneysel verilerle uyumluluğuna, model regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj- R^2), tahminlenmiş hata kareler toplamı (PRESS), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı (Pre- R^2) ve yeterli kesinlik (Adeq.Precision) değerlerine bakılarak karar verilmiştir ($R^2>0,9$; |Adj- R^2 - Pre- R^2 |<0,2; max.PRESS ; Pre- $R^2>0,7$; Adeq.Precision>4).

Bu testler sonucunda incelenen 6 biyoaktif özellikten 5 tanesinden istatistiksel olarak uygun modellerin elde edilmiştir. Bir tek lipaz inhibisyonu için uygun bir model hesaplanamadığından optimizasyonda yanıt olarak değerlendirilmemiştir. Bunun yanı sıra, α -glukosidaz inhibisyonu analizinde elde edilen inhibisyon %'si değerlerinin %2,7 ile %6,0 arasında değiştiği görülmüştür. Bu değişim bir matematiksel modelle istatistiksel olarak uygun şekilde açıklanmış olsa da, değerler birbirine çok yakın olduğundan ve bu küçük değerlerdeki farklılaşmanın pratikte anlamlı sonuçlar vermeyeceği düşünöldüğünden, α -glukosidaz inhibisyonu özelliği de optimizasyonda yanıt olarak değerlendirilmemiştir. Kalan 4 biyoaktif özellik (serbest radikal süpürme kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, ACE inhibisyonu ve α -amilaz inhibisyonu) optimizasyonda yanıt olarak kullanılmıştır.

Belirlenen 4 yanıt için her bir işlem değişkeninin her bir yanıtı doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden etkileri ANOVA çizelgesi oluşturularak değerlendirilmiştir (Tablo 4.11). Bu aşamada seçilmiş olan tüm regresyon modellerinin %94,3'ün üzerinde güven seviyesinde önemli olduğu görölmektedir. Diğer model istatistiklerine bakıldığında, “lack of fit” değerlerinin 0,4189'un üzerinde değerlerle önemsiz olduğu, Pred- R^2 değerlerinin de %72,07'nin üzerinde değerlere sahip olduğu hesaplanmıştır. Tüm bu değerler belirlenen modellerin deneysel sonuçları yeterli düzeyde açıkladığını göstermektedir. Ancak, model istatistiğinin geliştirilerek model etkinliğinin artırılması için, modelde bulunan önemsiz terimlerin model hiyerarşisine uygun olarak çıkartılması gerekmektedir. Buna göre, Tablo 4. 11'de p -değerı 0,1'den büyük olan model parametreleri istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiş ve model hiyerarşisine zarar vermeden modellerden çıkarılarak belirlenen modellerin etkinliği artırılmıştır.

Tablo 4.11. ANOVA sonucunda, her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler

Kaynak*	DF	Serbest Radikal		Metal bağlama		ACE İnhibiyonu		α -Amilaz	
		Süpürme Kapasitesi		Kapasitesi				İnhibisyonu	
		Kareler	p-değeri	Kareler	p-değeri	Kareler	p-değeri	Kareler	p-değeri
		Toplamı		Toplamı		Toplamı		Toplamı	
Model	9	18709,2	< 0,0001	424,32	< 0,0001	151,03	< 0,0001	9,78E+7	< 0,0001
x ₁	1	4010,2	0,0001	205,48	< 0,0001	27,81	0,0002	2,09E+5	0,5198
x ₂	1	1974,4	0,0019	59,11	< 0,0001	25,91	0,0003	3,53E+7	< 0,0001
x ₃	1	3548,6	0,0002	45,12	< 0,0001	13,49	0,0027	3,52E+6	0,0208
x ₁ x ₂	1	0,19	0,9678	35,79	< 0,0003	0,98	0,3114	38043,1	0,7815
x ₁ x ₃	1	40,1	0,5638	62,20	<0,0001	6,82	0,0184	1,03E+6	0,1686
x ₂ x ₃	1	571,6	0,0478	0,0043	0,9537	5,87	0,0261	1,64E+6	0,0906
x ₁ ²	1	976,7	0,2610	0,79	0,4352	15,11	0,0019	1,18E+5	0,6264
x ₂ ²	1	7039,6	0,1138	6,78	0,0387	36,87	< 0,0001	5,59E+7	< 0,0001
x ₃ ²	1	17,7	0,0024	7,62	0,0303	11,92	0,0040	2,09E+5	0,5192
Kalıntı	1	1124,2		11,98		8,63		4,69E+6	
Lack of fit	5	616,0	0,4189	7,00	0,3588	2,94	0,7576	1,48E+6	0,7923
Saf Hata	5	508,2		4,98		5,69		3,21E+6	
Toplam	19	19833,4		436,30		159,66		1,03E+8	
R ²		0,9433		0,9725		0,9460		0,9543	
Adj-R ²		0,8923		0,9478		0,8973		0,9131	
Pred-R ²		0,7207		0,8522		0,8088		0,8432	
Adeq. Precision		17,898		22,729		18,386		18,111	
PRESS		5539,91		64,50		30,52		1,61E+7	
C.V		1,71		4,36		1,90		9,44	

* x₁: İnkübasyon süresi; x₂: Ekzopeptidaz konsantrasyonu; x₃: Ultrases ön işlem süresi

Etkinliği arttırılarak belirlenmiş olan son modellerin katsayılarının da bulunduğu ANOVA tablosu ise Tablo 4.12’de gösterilmiştir. Buna göre tüm modellerin varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığı görülmektedir ($R^2 > 0.93,9$). Aynı zamanda R^2 ile Adj- R^2 arasındaki farkın %4,4’ün altında olması modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini gösterirken, Pred- R^2 değeri ile Adj- R^2 değerleri arasındaki farkın %20’nin altında olması (belirlenen modellerde %8,3 ve altında çıkmıştır), “Lack of fit” değerlerinin 0,1’in üzerinde olması (en

düşük değer 0,4672), C.V. değerinin 10'un altında olması (belirlenen modellerde en çok 8,91 hesaplanmıştır), Adeq.Precision değerinin 4'ten büyük olması (belirlenen modellerde en düşük değer 19,261 olmuştur) ve düşük PRESS değerlerine sahip olması belirlenmiş olan modellerin tahminleme açısından istatistiksel olarak uygun olduğunu göstermektedir.

Elde edilen modeller değerlendirildiğinde, tüm yanıtlar için değişim quadratik modellerle açıklanmıştır. Yanıtlar içerisinde α -amilaz inhibisyonu değerlerinin modellenmesinde verinin transformasyonuna ihtiyaç duyulmuş ve veri "Power" modeline göre $(y' = (y + k)^{\lambda})$ dönüştürülmüştür. Dönüşümde λ değeri 2, k sabiti ise 25,411 olarak alınarak veri dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Yanıtlardan birisinde (α -amilaz inhibisyonu) faktörlerden birisinin (inkübasyon süresi) doğrusal etkisi önemsiz görülürken, diğer tüm yanıtlarda tüm faktörlerin doğrusal etkileri önemli bulunmuştur.

Elde edilen modellerle işlem değişkenlerinin yanıtlar üzerine etkisinin görsel olarak da belirlenebilmesi için yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri çizilmesi planlanmıştır. Ancak, bu eğriler, yanıtlara olan interaksiyon etkilerin önemli olması durumunda anlamlı ve gerçekçi olarak çizilebilmektedir. Serbest radikal süpürme kapasitesi değişiminde 1, metal bağlama kapasitesi değişiminde 2, ACE inhibisyon değişiminde 2 ve α -amilaz inhibisyonu değişiminde 1 interaksiyon etki önemli bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerinde, işlem koşullarından birisi sabit tutulurken diğer ikisinin değişiminin yanıtlara etkisi gösterilmektedir. İnteraksiyon etkileri önemli bulunan yanıtların yanıt yüzey ve izohips eğrileri çizilmiştir (Şekil 4.14-4.19).

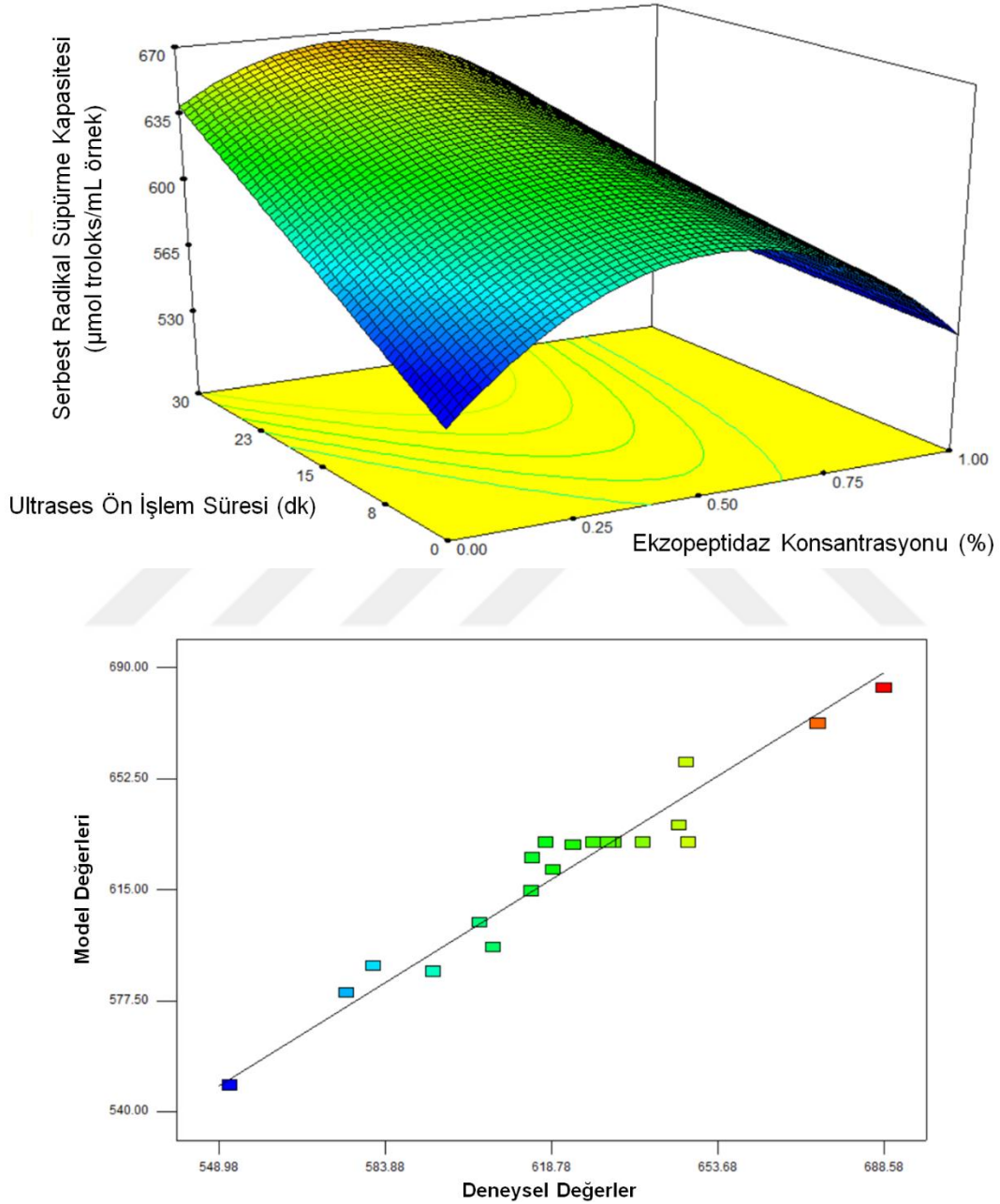
Tablo 4.12. ANOVA sonucunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamli olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra)

Kaynak*	Serbest	Radikal	Metal bağlama		ACE İnhibiyonu		α-Amilaz	
	Süpürme		Kapasitesi				İnhibisyonu	
	Kapasitesi							
	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri
Model	631,04	<0,0001	25,12	<0,0001	48,71	<0,0001	8594,98	<0,0001
x ₁	-17,05	<0,0001	3,86	<0,0001	1,42	0,0002	-	-
x ₂	-11,96	0,0004	-2,07	<0,0001	-1,37	0,0002	1598,66	<0,0001
x ₃	16,03	<0,0001	1,81	<0,0001	0,99	0,0024	504,97	0,0109
x ₁ x ₂	-	-	2,08	<0,0001	-	-	-	-
x ₁ x ₃	-	-	2,74	<0,0001	-0,91	0,0175	-	-
x ₂ x ₃	-8,30	0,0262	-	-	0,84	0,0250	445,22	0,659
x ₁ ²	-	-	-	-	1,02	0,0016	-	-
x ₂ ²	8,30	0,0054	0,70	0,0227	-1,59	<0,0001	-1943,56	<0,0001
x ₃ ²	-21,90	<0,0001	-0,70	0,0229	0,91	0,0035	-	-
Lack of fit	0,6135		0,4672		0,7417		0,8508	
R ²	0,9404		0,9707		0,9398		0,9389	
Adj-R ²	0,9129		0,9536		0,8960		0,9226	
Pre-R ²	0,8417		0,9107		0,8132		0,8771	
Adeq.	24,785		26,957		19,261		27,958	
Precision								
PRESS	3139,05		38,98		29,83		1,26E+7	
C.V	1,53		4,11		1,91		8,91	

* x₁: İnkübasyon süresi; x₂: Ekzopeptidaz konsantrasyonu; x₃: Ultrases ön işlem süresi

Şekil 4.14’de serbest radikal süpürme kapasitesinin değişimi üzerine ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin interaksiyon etkisi görülmektedir. Bu grafiğin çiziminde inkübasyon süresi 15 saatte sabit tutulmuştur. Şekil 4.14.’ten anlaşılacağı üzere, düşük ekzopeptidaz konsantrasyonlarında ultrases süresinin artışı ile serbest radikal süpürme kapasitesi artmıştır. Buna karşın, yüksek serbest radikal süpürme kapasitesi değerleri sağlamak için ekzopeptidaz konsantrasyonunun %0,2-0,6 aralığında ve ultrases süresinin 25 dakika veya üzerinde olmasının gerekli olduğu görülmektedir. Literatürde, keçi sütü kazeininden Flavourzyme®, Alcalase® ve Brauzyn enzimleri kullanılarak elde ettikleri hidrolizatların ultrases etkisiyle ABTS katyon radikal süpürme kapasiteleri ve örneklerin hidroliz derecelerinin önemli derecede arttığını belirtmilerdir (Magalhães ve diğerleri, 2022). Ultrases uygulaması kazeinler dahil olmak üzere proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesine

katkı sağlamaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018). Ayrıca, keçi sütünden elde edilen kazein hidrolizatlarında farklı inkübasyon sürelerinin antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak hidroliz süresinin 150. dakikasında maksimum serbest radikal süpürme kapasitesine ulaşılmıştır (yaklaşık %45) (Shu ve diğerleri, 2016).

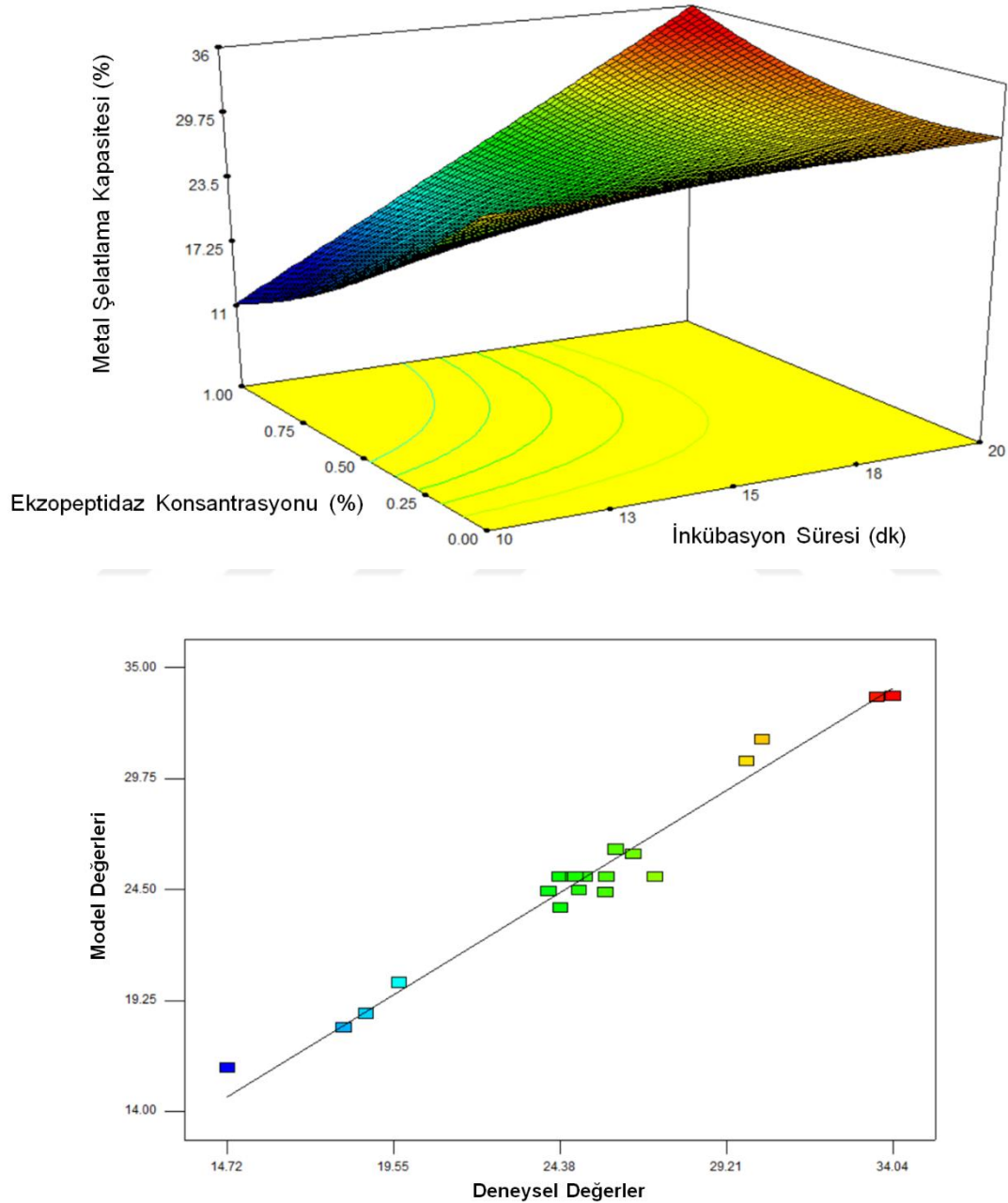


Şekil 4.14. Ekzopectidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin serbest radikal süpürme kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi

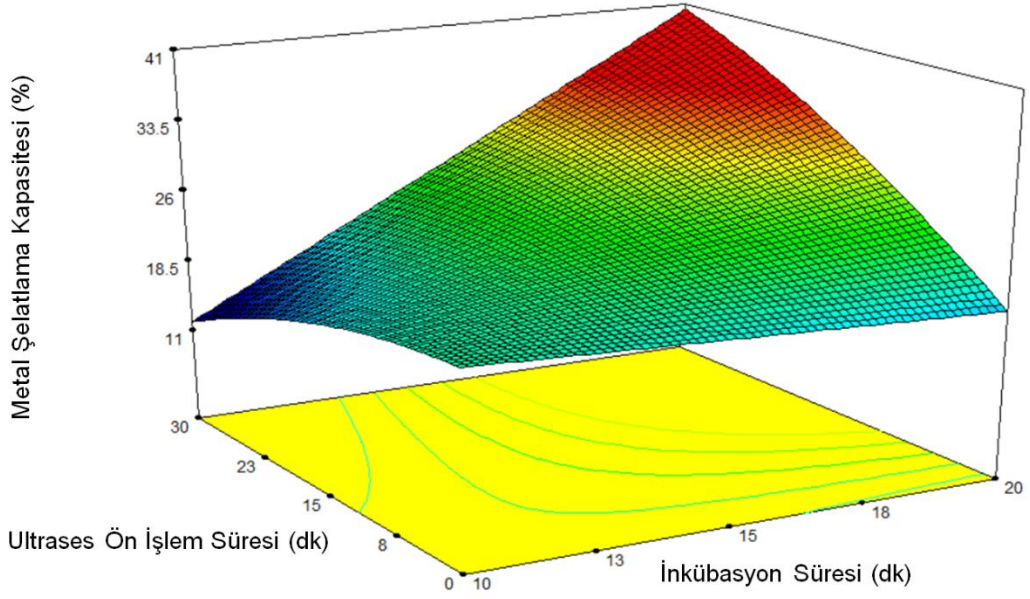
Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da metal bağlama kapasitesinin, inkübasyon süresi ve ekzopeptidaz konsantrasyonu ile değişimi ile inkübasyon süresi ve ultrases süresiyle değişimi grafikleri verilmiştir. Şekil 4.15'te inkübasyon süresi 15 dakikada değişmez kabul edilirken, Şekil 4.16'da ise ekzopeptidaz konsantrasyonu %0,5 olarak sabitlenmiştir. Şekil 4.15'te uzun inkübasyon sürelerinde daha yüksek metal bağlama kapasitesi değerlerinin elde edilebildiği ve Ekzopeptidaz konsantrasyonunun önemsizleştiği anlaşılmaktadır. Şekil 4.16'da ise ultrases işlemi uygulanmadan inkübasyon süresinin etkisi önemli görünmezken, uygulanan ultrases ön işlemi ile beraber inkübasyon süresinin metal bağlama kapasitesi üzerine artan ve pozitif bir etkisinin olduğu görülmektedir. Yüksek metal bağlama kapasitesinin uzun ultrases ön işlemi sonrası, uzun inkübasyon süreleri ile elde edilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, keçi sütünden elde edilen kazein hidrolizatlarında farklı inkübasyon sürelerinin antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak hidroliz süresinin 90. Dakikada maksimum metal bağlama yeteneğine sahip olduğu ve optimum çalışma süresinin 150. Dakikada olduğu belirlenmiştir. Hidrolizatların bu dakika sonrasında metal bağlama yeteneklerinde kayıp gözlemlenmiştir. Veriler doğrultusunda 30 dakika ultrases işleminin yaklaşık %35 metal bağlama aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar optimum noktada elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda maksimum 18 saate kadar inkübasyon süresindeki örneklerin metal bağlama yetenekleri düşük bulunmuştur (Shu ve diğerleri, 2016). Bunun nedeni olarak enzim substrat miktar oranlarının, üretim ve hammadde farklılıklarının olması olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de inkübasyon ile ultrases sürelerinin ve ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin ACE inhibisyonu üzerine etkisi yanıt yüzey grafiklerine yansıtılmıştır. Şekil 4.17'de, yüksek ACE inhibisyonu elde etmek için farklı seçenekler denenebileceği anlaşılırken, ultrases ön işlemi gerçekleştirilmeden, kısa inkübasyon süresi ile ACE inhibisyonunun minimize edilebileceği görülmektedir. ACE inhibisyonunu maksimize etmek için ise ultrases ön işlemi uygulamadan inkübasyon süresini maksimize etmek, uzun ultrases ön işlemi ile inkübasyon süresini 10 saat düzeylerinde tutmak veya uzun ultrases ön işlemi sonrası uzun inkübasyon sürelerinde çalışmak denenebilir. Şekil 4.18'de ultrases ön işlemie göre ekzopeptidaz konsantrasyonunun ACE inhibisyonu üzerine etkisinin daha belirleyici olduğu görülmektedir. Uygulanan ultrases ön işleminden bağımsız olarak, ekzopeptidaz konsantrasyonunun artışı ile önce ACE inhibisyonunun arttığı, sonra ise azaldığı grafikten

yorumlanmaktadır. En yüksek ACE inhibisyon değerlerine ise uzun ultrases ön işlemi ve %0,2-0,7 aralığındaki ekzopeptidaz kullanımı ile ulaşılabilmektedir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, kazein hidrolizatlarında ultrases etkisinin ACE inhibisyon aktivitesi üzerine yapılan bu çalışmada maksimum inhibisyon noktasını etkilemediği fakat süreci 6 kat daha kısalttığı belirtilmiştir (Madadlou ve diğerleri, 2011).

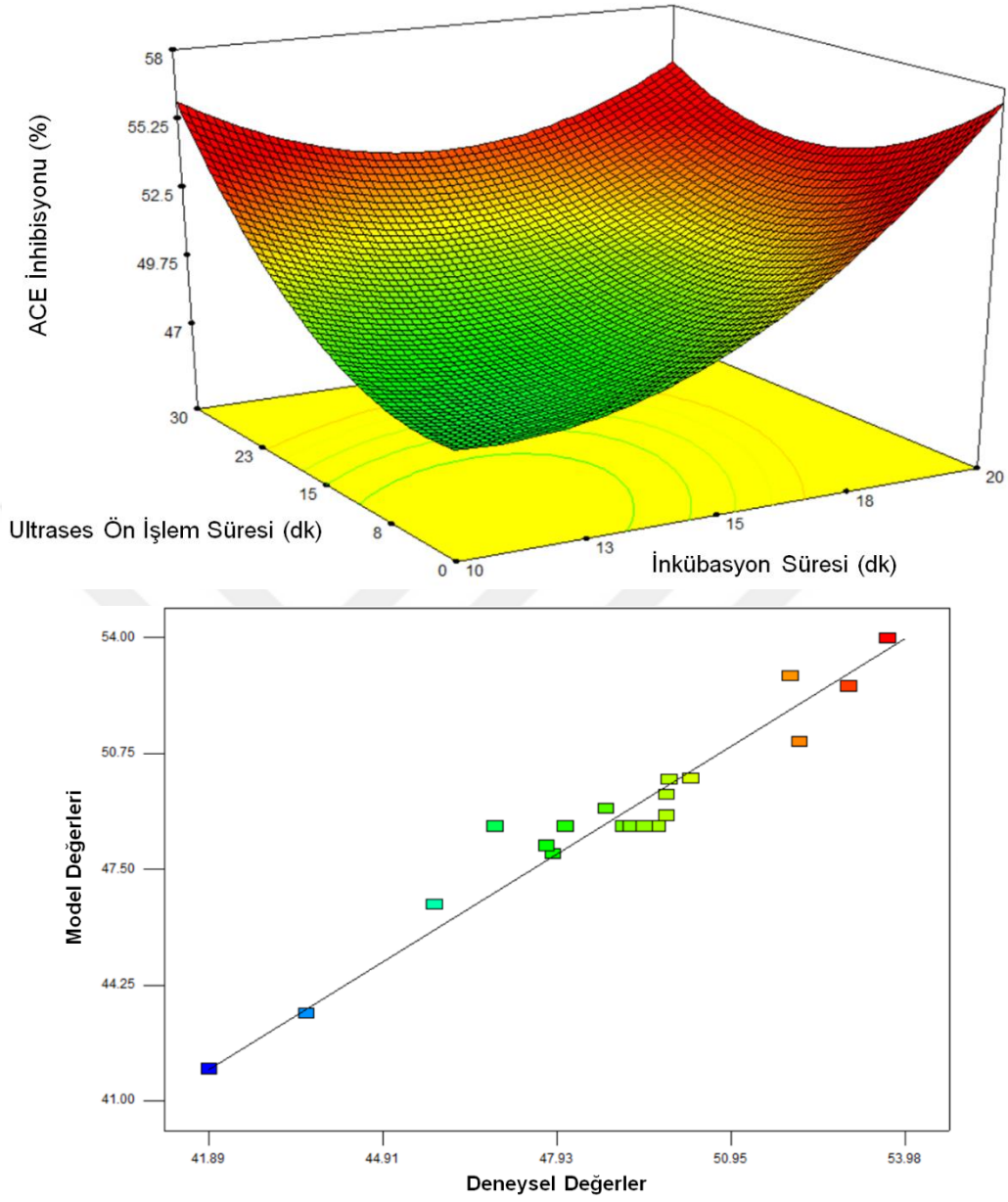


Şekil 4.15. İnkübasyon süresi ile ekzopeptidaz konsantrasyonunun metal bağlama kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi

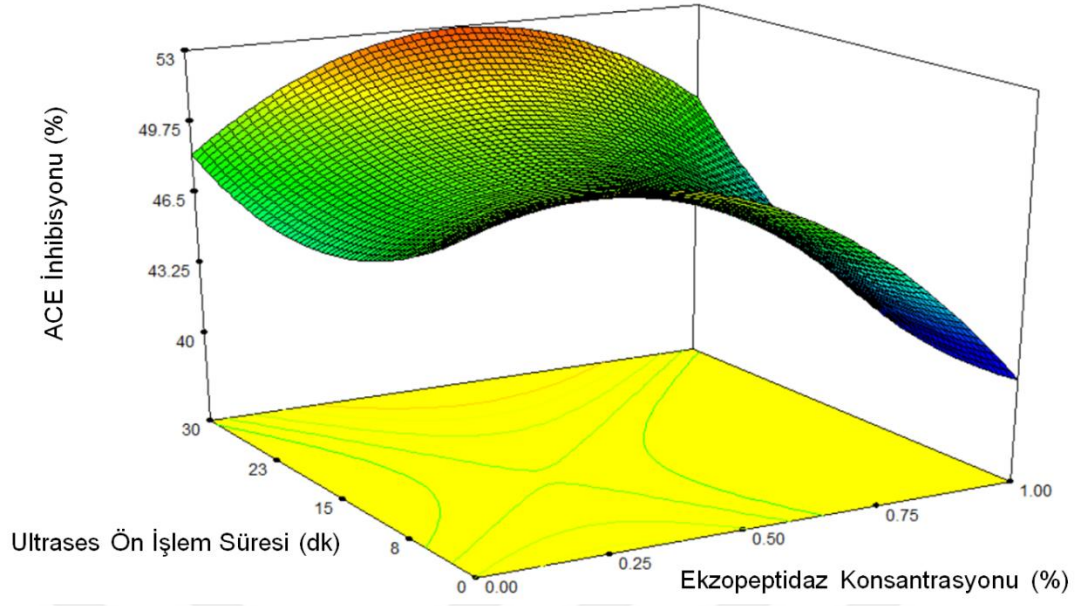


Şekil 4.16. Ekzopektidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin metal bağlama kapasitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

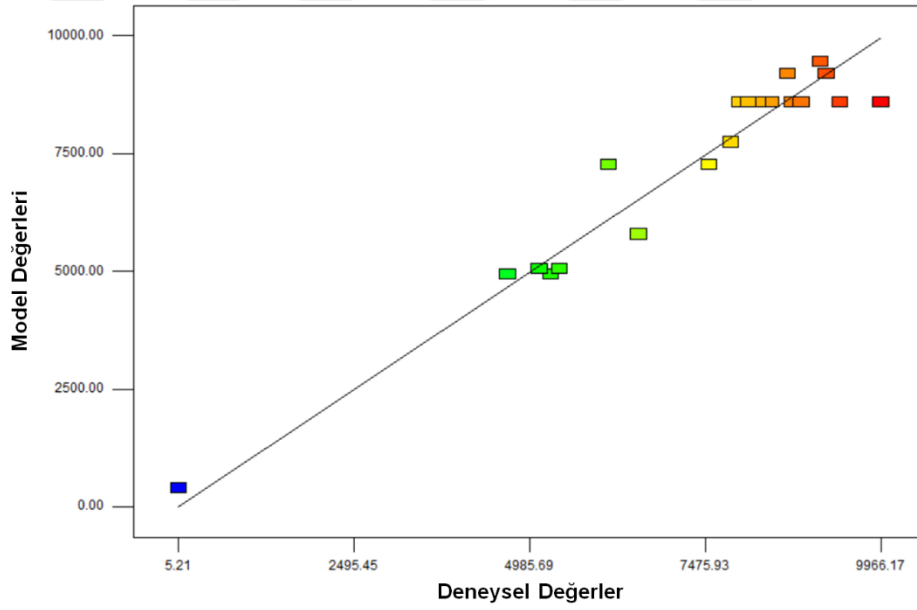
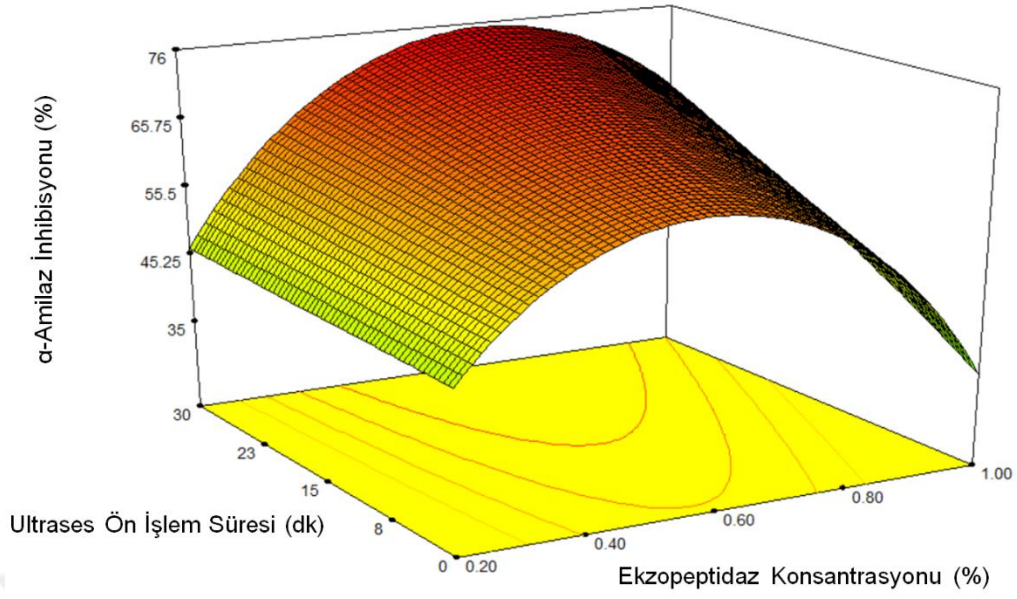
Şekil 4.19’da ise ultrases ön işleme süresi ile ekzopektidaz konsantrasyonunun α -amilaz inhibisyonu değişimine etkisi gösterilmiştir. Buna göre, uzun ultrases ön işleme sonrası %0,5-0,8 konsantrasyonlarda ekzopektidaz kullanımı ile α -amilaz inhibisyonunun maksimize edilebileceği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.17. İnkübasyon süresi ile ultrases süresinin ACE inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi



Şekil 4.18. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin ACE inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği



Şekil 4.19. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ultrases süresinin α -amilaz inhibisyonu üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve model değerleri ile deneysel değerlerin ilişkisi

4.3.3. Optimizasyon ve Doğrulama

Optimizasyonda 4 farklı biyoaktif özellik kullanılmıştır. Ancak, peptitlerde hedeflenen en önemli biyoaktif özellik ACE inhibisyonu olduğundan, bu özelliğin optimizasyondaki ağırlığı daha yüksek tutulmuştur. ACE inhibisyonunun ağırlığı 5 olarak verilirken, diğer tüm özellikler 3 düzeyinde bir ağırlıkla optimizasyonda kullanılmıştır. İstenilirlik fonksiyonu yöntemi ile elde edilen optimum çalışma koşulu 20 saat inkübasyon süresi, %0,5 ekzopeptidaz konsantrasyonu

ve 30 dakika ultrases ön işlem süresi olmuştur. Bu koşullarda gerçekleştirilecek üretimler sonucunda elde edilecek olan kazein hidrolizatlarının serbest radikal süpürme kapasitesi değerinin 652,9 μmol troloks/mL örnek, metal bağlama kapasitesinin %40,4, ACE inhibisyonunun %55,6 ve α -amilaz inhibisyonunun %71,7 olması öngörülmüştür. Analiz sonucunda “istenilirlik fonksiyonu” değeri, 0.927 gibi oldukça yüksek bir değer olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen teorik optimum işlem koşulunun, deneysel veri ile doğrulaması da yapılmıştır. Bu amaçla, hesaplanmış olan optimum işlem koşulunda 4 ek üretim yapılmış ve optimizasyonda kullanılan yanıtlar deneysel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçların istatistiksel analizi Tablo 4.13’te paylaşılmıştır. Buna göre, doğrulama üretimleri sonrasındaki analizler sonucunda elde edilen ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla, serbest radikal süpürme kapasitesi $662,68 \pm 10,15$ μmol troloks/mL örnek, metal bağlama kapasitesi $\%39,71 \pm 1,47$, ACE inhibisyonu $\%55,06 \pm 0,86$ ve α -amilaz inhibisyonu $\%70,11 \pm 1,19$ olarak bulunmuştur. Bu değerler, teorik optimizasyon sonucunda tahmin edilen değerlere oldukça yakın değerlerdir. Aynı zamanda, yapılan T-testi de tahmin edilen teorik değerlerle deneysel değerlerin istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermektedir (p-değeri>0,05).

Tablo 4.13. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması

Yanıt	Tahminlenen Sonuçlar	Deneysel Sonuçlar ^a	SH ^b	Fark	% Hata ^c	<i>p</i> -değeri
Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi (μ mol troloks/mL örnek)	652,95	662,65 $\pm$ 10,15	5,08	9,72	1,47	0,152
Metal bağlama Kapasitesi (%)	40,40	39,71 $\pm$ 1,47	0,74	-0,70	1,75	0,425
ACE İnhibisyonu (%)	55,63	55,06 $\pm$ 0,86	0,42	-0,57	1,04	0,275
α -Amilaz İnhibisyonu (%)	71,70	70,11 $\pm$ 1,19	0,59	-1,59	2,27	0,075

^a Ortalama deneysel değer $\pm$ standart sapma.

^b Ortalama standart hata.

$$^c \%Hata = \frac{|y_{deneysel} - y_{tahmin\ edilen}|}{y_{deneysel}} \times 100$$

4.3.4. Optimum Koşullarda Üretilen Örneğin Antimikrobiyal Potansiyeli

E. coli bakterilerinin sonuçları incelendiğinde, örneklerin bakterilerin büyümesi üzerinde engelleyici bir etki bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.20). Aynı zamanda aynı şekilde test edilen kazein hidrolizatlarının Gram (+) *S. aureus* bakterilerinin büyümesini baskılayıcı bir etki bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Analiz sırasında pozitif kontrol olarak Cefotaxime ve Chloramphenicol antibiyotikleri kullanılmıştır ve örneklerin kod ve konsantrasyonları Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. Şekil 4.20’de ve Şekil 4.21’de antimikrobiyal aktivite verilerinin temsil ettiği örnek bilgileri

Örnek No	Örnek Konsantrasyonu (mg/mL)
1	4
2	0,4
3	0,04
4	0,004
5	Kör (saf su)
Cefotaxime	25-50
Chloramphenicol	0,25-0,50



Şekil 4.20. Optimum üretim koşulları belirlenen yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatlarının farklı konsantrasyonlarındaki *E.coli* türüne karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi



Şekil 4.21. Optimum üretim koşulları belirlenen yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatlarının farklı konsantrasyonlarındaki *S.aureus* türüne karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi

4.3.5. İşlem Koşullarının Biyoaktivite Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Optimizasyon aşamasında elde edilen sonuçların değerlendirmesini desteklemek ve faktörlerin modellenen veya modellenemeyen yanıtlar üzerindeki etkilerini yorumlamak ve CCRD deneme planı ile elde edilen sonuçları desteklemek üzere, ek üretim ve analizler gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, kazein hidrolizatı üretimindeki işlem koşullarının hidrolizatların biyoaktivitelerine etkilerinin saptanması için 7 farklı işlem koşulunda, 3 tekerrürlü olacak şekilde üretimler yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan deneme planında belirlenen işlem koşulları, optimizasyon çalışmasındaki sınır koşulları ile aynıdır ve CCRD doğrultusunda yapılan üretilere ek olarak 12 farklı üretim daha gerçekleştirilmiştir. Yapılan üretimlerin listesi Tablo 4.15'te verilmiştir ve bu sonuçların istatistiksel değerlendirmesini de içeren toplu gösterimi ise Tablo 4.16'da sunulmuştur. Üretilen kazein hidrolizatları analiz edilmiş ve hidrolizatların biyoaktivite özellikleri ile işlem koşullarının değişiminin önemliliği tek değişkenli varyans analizi ile belirlenmiştir. Belirlenmiş olan önemlilik derecelerine göre örneklerin gruplanmasında ise Duncan testinden yararlanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalarda SPSS istatistiksel paket programı kullanılmıştır.

Tablo 4.15. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla kullanılan deneme deseni

Deneme No	İnkübasyon Süresi (saat)	Ekzopeptidaz Konsantrasyonu (%)	Ultrases Ön İşlem Süresi (dakika)
1, 4, 5, 9, 15, 19	15	0,5	15
3, 21, 22	10	0,5	15
16, 23, 24	20	0,5	15
6, 25, 26	15	0	15
13, 27, 28	15	1,0	15
12, 29, 30	15	0,5	0
8, 31, 32	15	0,5	30

Tablo 4.16. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla üretilen kazein hidrolizatlarının analiz sonuçları

Üretim No	TPM ¹	ABTS katyon bağlama ²	Metal bağlama (%) ³	ACE İnhibisyonu (%) ⁴	α -Amilaz İnhibisyonu (%) ⁵	α -Glukosidaz İnhibisyonu (%) ⁶	Lipaz İnhibisyo nu (%) ⁷
21	479,9	670,5	20,4	46,8	67,9	4,9	14,5
22	486,8	668,4	20,8	46,7	69,0	4,9	13,8
23	528,1	601,3	31,3	51,8	62,7	5,8	10,4
24	529,0	614,7	27,6	49,4	62,8	5,9	11,4
25	210,5	576,9	27,1	44,6	-25,3	3,6	16,5
26	201,2	573,7	27,3	43,6	-26,4	3,6	14,5
27	577,6	585,1	24,8	42,8	57,0	2,8	11,3
28	580,5	578,7	25,8	48,1	59,0	2,9	11,4
29	520,8	596,3	21,5	49,8	63,2	5,3	9,1
30	520,8	582,1	20,5	49,4	63,6	5,1	8,8
31	537,5	643,2	25,2	51,0	70,0	5,8	13,4
32	556,5	639,5	25,1	52,0	70,9	5,5	13,3

¹ TPM: Toplam Peptit Miktarı, mg Tripton/g örnek olarak verilmiştir.

² Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi, μ mol troloks/mL örnek olarak verilmiştir.

³ Analiz sonucu 0,043 mg protein/mL için verilmiştir.

⁴ Analiz sonucu 5,700 mg protein/mL için verilmiştir.

⁵ Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁶ Analiz sonucu 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁷ Analiz sonucu 42,75 mg protein/mL için verilmiştir.

Üretilen örneklerin işlem koşullarıyla değişimi Tablo 4.17’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, toplam peptit miktarı (TPM) inkübasyon süresi ile artmış ve bu artış 20.saatte istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmıştır ($p<0,05$). Ekzopeptidaz konsantrasyonunun artışının TPM üzerindeki etkisi ise çok belirgindir. %1 oranında ekzopeptidaz ilave edilmiş örnekteki TPM değeri, ilave edilmemiş örnekten 2,7 kattan fazla yüksek bulunmuştur. Ultrases işlemi ile ise TPM değişimi dalgalı bir seyir izlemiştir. Ultrases işlemi ile önce azalmış, sonra ise artmıştır ($p<0,05$).



Tablo 4.17. Kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının hidrolizat biyoaktif özellikleri üzerine etkileri

Biyoaktivite	İnkübasyon Süresi (Saat)			Ekzopeptidaz Konsantrasyonu (%)			Ultrases Ön İşlem (Dakika)		
	10	15	20	0	0,5	1	0	15	20
TPM ¹	477,98±9,87 ^a	487,52±15,09 ^a	528,95±0,81 ^b	209,44±7,76 ^a	487,52±15,09 ^b	570,19±15,41 ^c	517,05±6,56 ^b	487,52±15,09 ^a	554,37±15,93 ^c
SRSK ²	675,82±11,09 ^c	632,02±4,36 ^b	610,22±7,77 ^a	577,28±3,79 ^a	632,04±4,36 ^b	571,69±18,02 ^a	593,99±10,95 ^a	632,02±4,36 ^b	643,26±3,77 ^b
MŞK ³	19,98±1,08 ^a	24,96±0,51 ^b	29,71±1,89 ^c	28,06±1,51 ^b	24,96±0,51 ^a	24,99±0,73 ^a	20,56±0,88 ^a	24,96±0,51 ^b	25,60±0,79 ^b
ACE-I ⁴	47,43±1,18 ^a	49,11±0,61 ^a	51,62±2,12 ^b	46,66±1,10 ^a	49,11±0,61 ^b	44,26±3,31 ^a	48,98±1,12 ^a	49,11±0,61 ^a	51,33±0,57 ^b
α -Amilaz-i ⁵	67,03±2,55 ^a	66,76±3,21 ^a	63,93±2,07 ^a	ND	66,76±3,21	57,15±1,81	64,01±1,14 ^a	66,76±3,21 ^a	71,35±1,59 ^b
α -Glukosidaz-i ⁶	4,87±0,04 ^b	3,59±0,29 ^a	5,88±0,04 ^c	3,60±0,04 ^b	3,59±0,29 ^b	2,82±0,08 ^a	5,06±0,26 ^b	3,59±0,29 ^a	5,59±0,22 ^b
Lipaz-i ⁷	14,50±0,66 ^b	10,16±0,55 ^a	10,87±0,49 ^a	15,75±1,13 ^b	10,16±0,55 ^a	10,92±0,78 ^a	8,51±0,78 ^b	10,16±0,55 ^a	13,46±0,15 ^a

^{a-c} Aynı harfler, farklı üretim koşullarında üretilen örneklerin farklı olmadığını göstermektedir (p>0,05).

¹TPM: Toplam Peptit Miktarı, mg Tripton/g örnek olarak verilmiştir.

²AKRBK: ABTS Katyon Radikal Bağlama Kapasitesi, μ mol troloks/mL örnek olarak verilmiştir.

³MBK: Metal bağlama Kapasitesi, analiz sonucu yüzde olarak ve 0,043 mg protein/mL için verilmiştir.

⁴ACE-I: ACE inhibisyonu, analiz sonucu yüzde olarak ve 5,70 mg protein/mL için verilmiştir.

⁵ α -Amilaz-I: α -Amilaz inhibisyonu, analiz sonucu yüzde olarak ve 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁶ α -Glukosidaz-i: α -Glukosidaz inhibisyonu, analiz sonucu yüzde olarak ve 85,50 mg protein/mL için verilmiştir.

⁷Lipaz-i: Lipaz inhibisyonu, analiz sonucu yüzde olarak ve 42,75 mg protein/mL için verilmiştir.

*ND: Tespit edilemedi.

Hidrolizatların serbest radikal süpürme kapasitesi, inkübasyon süresi ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmakla beraber düşük düzeylerde azalmış, ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ise belirgin değişim göstermiştir. Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile serbest radikal süpürme kapasitesi önce artmış, sonra azalmıştır ($p<0,05$). Ultrases ön işlemi ise serbest radikal süpürme kapasitesini arttırmış ve bu artış 15.dakikada istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmış, sonrasında değer sabit kalmıştır ($p>0,05$). Kazein hidrolizatlarının metal bağlama kapasiteleri değerlendirildiğinde, inkübasyon süresi ile istatistiksel açıdan önemli düzeyde pozitif ilişki bulunurken, ekzopeptidaz konsantrasyonu ile ise negatif ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). Ekzopeptidaz konsantrasyonu ile metal bağlama kapasitesi önce azalmış ve bu azalma %0,5 konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0,05$), sonrasında ise değer sabit kalmıştır ($p>0,05$). Ultrases ön işlem süresiyle de sonuçlar önce artış göstermiş ve 15.dakikadan sonra ise değişim durmuştur ($p>0,05$).

ACE inhibisyonu değerlerine göre inkübasyon süresinde aktivite artmış fakat inkübasyon süresinin 20.saatinde bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir ifadeye ulaşmıştır ($p<0,05$). Ekzopeptidaz konsantrasyonu ACE inhibisyonunu önce arttırmış, sonra ise yüksek konsantrasyonlarda inhibisyonun azalmasına sebep olmuştur. Ultrases ön işlemi uygulanması ise ACE inhibisyonunu arttırmış ($p<0,05$), ancak 15 ve 30 dakikalık işlem uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$).

α -amilaz inhibisyon aktivitesi değerleri değerlendirildiğinde inkübasyon süresi biyoaktivite değerlerini etkilememiştir ($p>0,05$). Buna karşın, ekzopeptidaz uygulamasının α -amilaz inhibisyonu üzerine çok önemli etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ekzopeptidaz uygulaması yapılmayan örneklerde α -amilaz aktivasyonu saptanırken, %0,5 konsantrasyonda ekzopeptidaz ilavesi ile belirgin α -amilaz inhibisyonu saptanmıştır. Bu inhibisyonun ise %1 düzeylerindeki ekzopeptidaz uygulamalarında azaldığı ölçülmüştür. Ultrases ön işleminin de α -amilaz inhibisyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkiye sahip olduğu görülmüş, bu etkinin ise uzun süreli ultrases ön işlem uygulaması ile ortaya çıktığı saptanmıştır ($p<0,05$). Kazein hidrolizatlarının α -glukosidaz enzimini inhibisyon etkisi ise tüm örneklerde saptanmıştır. Buna karşın bu etki oldukça küçük bir yüzdelik dilimde dağılmıştır. Saptanan en yüksek α -glukosidaz inhibisyonu %2,82 iken en yüksek değer %5,88'dir. Her ne kadar α -glukosidaz inhibisyonunda bazı değişimler istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde bulunsan da,

değer aralıklarının çok küçük olması nedeniyle pratikte bu farkların anlamlı olmadığı yorumlanmıştır. Çalışma kapsamında üretilen hidrolizatların lipaz inhibisyonları değerlendirildiğinde ise, inkübasyon süresinin ve ekzopeptidaz konsantrasyonunun artışı ile azaldığı, ultrases ön işlem süresinin artışı ile ise arttığı saptanmıştır ($p<0,05$).

4.4. Ayran Analizleri

4.4.1. Ayran Bileşim Analizleri

Belirtilen 3 farklı hidrolizat ekleme oranı ve 3 farklı depolama koşulunda alınan numunelerden elde edilen protein, pH ve toplam asitlik değerlerinin sonuçları Tablo 4.18'de sunulmuştur.

Örneklerin protein değerlerine bakıldığında, tüm örneklerde 1. gün depolamanın 7. ve 14. gün depolama değerlerinden istatistiksel olarak farkı anlamlı bulunurken, 7. ve 14. gün depolama koşullarında değişen protein miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Örneklerin 1 gün depolama koşullarında kontrol ve %1 oranında kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin aralarında gözlemlenen değişimi istatistiksel olarak anlamlı görünürken ($p<0,05$) %5 ve %10 kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin kendi aralarındaki değişimi anlamsız ($p>0,05$) fakat bu iki örneğin protein miktarlarındaki farkı diğer örneklerin sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlıdır. 7. ve 14. gün depolanan örneklerin depolamaya bağlı olarak protein değerlerinde gözlemlenen değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Bu durumda örneklerin hidroliz süresinin protein miktarında etkili olduğu sonucunu çıkartılabilir. Dinç ve Kahyaoğlu, (2021) ticari ve açıkta satılan ayran örneklerinden alınan numunelerde bileşim analizlerini değerlendirmişlerdir. Ayranların protein değerleri % 1,33 ile 2,91 arasında değişim göstermektedir. Bu sonuçlar, tez çalışması sonucunda elde edilen protein miktarlarıyla uyumlu bulunmuştur. Dinç ve Kahyaoğlu (2021)'nin çalışmasında elde edilen bazı protein değerlerinin tez çalışmasında elde edilen protein konsantrasyonlarından düşük olmasının olası sebebinin ise hidrolizat eklenmesi olabileceği düşünülmektedir (Dinç ve Kahyaoğlu, 2021).

Tablo 4.18. Optimum koşullarda üretilen ve yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin protein, pH ve titrasyon asitlik analiz sonuçları

Örnek	Depolama (Gün)	Protein İçeriği (%)	pH (-)	Titrasyon Asitliği (%)
Kontrol	1	2,14±0,00 ^{a,x}	4,64±0,00 ^{c,y}	0,52±0,02 ^{a,x}
	7	2,35±0,02 ^{b,x}	4,45±0,02 ^{b,z}	0,56±0,01 ^{b,x}
	14	2,38±0,01 ^{b,x}	4,22±0,01 ^{a,x}	0,55±0,00 ^{b,x}
%1	1	2,29±0,02 ^{a,y}	4,56±0,00 ^{c,x}	0,59±0,00 ^{a,y}
	7	2,38±0,00 ^{b,xy}	4,39±0,00 ^{b,y}	0,60±0,02 ^{a,y}
	14	2,41±0,01 ^{b,xy}	4,29±0,01 ^{a,z}	0,61±0,00 ^{a,y}
%5	1	2,55±0,00 ^{b,z}	4,57±0,01 ^{c,x}	0,60±0,00 ^{a,y}
	7	2,41±0,00 ^{a,y}	4,34±0,00 ^{b,x}	0,65±0,02 ^{b,z}
	14	2,45±0,03 ^{a,yz}	4,22±0,00 ^{a,x}	0,71±0,00 ^{c,z}
%10	1	2,57±0,00 ^{b,z}	4,53±0,00 ^{c,x}	0,65±0,01 ^{a,z}
	7	2,47±0,00 ^{a,z}	4,35±0,00 ^{b,x}	0,73±0,00 ^{b,t}
	14	2,47±0,03 ^{a,z}	4,25±0,00 ^{a,y}	0,75±0,01 ^{b,t}

* Kontrol: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatı eklenmeden elde edilen ayran; %1: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %1 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; %5: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %5 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; %10: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %10 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; a-c: depolama ile değişim; ^{x-t}: örnekler arasındaki değişimi ifade etmektedir (p>0,05).

Örneklerin pH değerlerinde genel olarak depolama süreciyle doğru orantıda değerlerin arttığı gözlemlenmektedir. Ayrıca depolamanın 1.gününde %1, %5 ve %10 oranında eklenen kazein hidrolizatlı ayran örneklerinin kendi aralarında pH değerlerinin farklı olmadığı fakat kontrol örneğinden farklı bir pH'da bulunduğu belirlenmiştir. 7 gün depolama sürecinde ise pH değerinin kazein hidrolizatı oranıyla doğru oranlı bir şekilde düştüğü fakat %5 ve %10 hidrolizat ilave edilmiş ayran örneklerinin aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz kabul edildiği (p<0,05) tespit edilmiştir. Genel olarak 14. günde depolamaya bağlı olarak pH değerlerinde düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Dinç ve Kahyaoğlu, (2021) ticari ve açıkta satılan ayran örneklerinde pH değerlerini 3,67 ile 4,73 arasında bulmuşlardır (Dinç ve Kahyaoğlu, 2021). Bu sonuçlar elde edilen sonuçlar pH değer aralıklarıyla uyumlu bulunmuştur. Elazığ Üniversitesinde ayran ile ilgili yapılan bir çalışmada ayran örneklerinin pH değerleri 3,59 ile 4,20 arasında değişim göstermektedir (Patır ve

diğerleri, 2006). Bu sonuçlar elde edilen değerlerden düşük bulunmuştur. Bunun nedeni olarak hidrolizat eklenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ayranların uzun süre dayanıklılığı üzerine etki eden en önemli parametrelerden biri de asitlik miktarıdır. Asitlik miktarı depolama süresine bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir (Dinç ve Kahyaoğlu, 2021). Türk Gıda Kodeksi Fermente süt ürünlerine göre asitlik miktarının en az % 0,5 en fazla % 1 olması beklenmektedir. Ayranın yapısal özelliklerinin iyileştirilmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada asitlik değerlerinin kontrol örneklerinde % 0,65 olarak bulunmuştur (Köksoy, 2003). Bu sonuç elde ettiğimiz kontrol örneğinden yüksek değerde bulunmuştur. Bunun nedeni olarak açıkta yapılan ayranın tuz standardizasyonunun farklı olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.4.2. Ayran Biyoaktivite Analizleri

Tablo 4.19’da optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatların farklı konsantrasyonda ayran örneklerine ilave edilmesiyle üretilen ürünlerin depolama süresince biyoaktivite değişimleri verilmiştir. Kontrol grubu örneklerin TPM değerleri 2,02 ile 2,31 aralığında, %1 konsantrasyonda ilave edilen ayranların 2,31 ile 2,59 aralığında, %5 konsantrasyondaki örneklerin 6,24 ile 6,52 aralığında ve %10 konsantrasyondaki örneklerin 9,66 ile 10,12 aralığında değişim göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre ayran örneklerinin ilave edilen hidrolizat konsantrasyonuna bağlı olarak toplam peptit miktarları artış göstermektedir. Kontrol grubu örneklerin, depolama süresince değişimleri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). % 1 konsantrasyonda hidrolizat ilave edilen ayran örneklerinin depolama süresine bağlı değişimlerinde 7. ve 14. gün’de bulunan toplam peptit miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizken, 1. gün depolama koşullarında belirlenen toplam peptit değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. % 5 ve % 10 konsantrasyonda kazein hidrolizat ilaveli ayran örneklerinde depolama süresine bağlı olarak toplam peptit miktarlarında gözlemlenen değişim istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.19. Farklı enzimlerle ve inkübasyon sürelerinde üretilen kazein hidrolizatlarının toplam peptit miktarı, ABTS katyon radikal süpürme kapasitesi ve metal bağlama kapasite analizlerinin sonuçları

Depolama (Gün)	Örnek Konsantrasyon (%)	Toplam PeptitMiktarı (mg Tripton / g örnek)	ABTS Katyon Bağlama (μ mol Troloks / mL örnek)	Metal Bağlama (%) ²
1	Kontrol	2,26 $\pm$ 0,02 ^{b,x}	5,79 $\pm$ 0,02 ^{a,x}	15,13 $\pm$ 0,14 ^{c,x}
	1	2,59 $\pm$ 0,09 ^{b,y}	5,72 $\pm$ 0,03 ^{a,x}	15,16 $\pm$ 0,06 ^{c,x}
	5	6,24 $\pm$ 0,00 ^{a,z}	13,94 $\pm$ 0,17 ^{a,y}	22,90 $\pm$ 0,01 ^{c,y}
	10	9,72 $\pm$ 0,26 ^{a,t}	19,18 $\pm$ 0,49 ^{a,z}	21,06 $\pm$ 0,05 ^{b,y}
7	Kontrol	2,31 $\pm$ 0,12 ^{b,x}	6,38 $\pm$ 0,07 ^{b,x}	13,43 $\pm$ 0,16 ^{b,x}
	1	2,42 $\pm$ 0,09 ^{a,x}	6,87 $\pm$ 0,09 ^{b,y}	13,58 $\pm$ 0,44 ^{b,x}
	5	6,52 $\pm$ 0,05 ^{a,y}	16,55 $\pm$ 0,12 ^{b,z}	13,57 $\pm$ 0,08 ^{b,x}
	10	9,66 $\pm$ 0,14 ^{a,z}	20,66 $\pm$ 0,06 ^{b,t}	17,60 $\pm$ 0,40 ^{a,y}
14	Kontrol	2,02 $\pm$ 0,01 ^{a,x}	6,74 $\pm$ 0,11 ^{c,x}	12,75 $\pm$ 0,20 ^{a,y}
	1	2,32 $\pm$ 0,04 ^{a,x}	7,08 $\pm$ 0,02 ^{c,y}	12,47 $\pm$ 0,25 ^{a,y}
	5	6,45 $\pm$ 0,70 ^{a,y}	17,68 $\pm$ 0,22 ^{c,z}	11,98 $\pm$ 0,05 ^{a,x}
	10	10,12 $\pm$ 1,09 ^{a,z}	20,92 $\pm$ 0,05 ^{b,t}	15,67 $\pm$ 1,15 ^{a,z}

* Kontrol: Hidrolizat eklenmeyen ayran;

%1: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %1 oranında eklenmesiyle üretilen ayran;

%5: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %5 oranında eklenmesiyle üretilen ayran;

%10: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %10 oranında eklenmesiyle üretilen ayran;

a-c: depolama ile değişimi; x-t: örnekler arasındaki değişimi ifade etmektedir (p>0,05).

¹TPM: Toplam Peptit Miktarı, mg Tripton/g örnek olarak verilmiştir.

²AKBK: ABTS Katyonu Bağlama Kapasitesi, μ mol troloks/mL örnek olarak verilmiştir.

³MŞK: Metal bağlama Kapasitesi, analiz sonucu yüzde olarak ve 0,043 mg protein/mL için verilmiştir.

Örneklerin ABTS katyon radikal süpürme kapasite değerleri 5,72 ile 20,92 aralığında değişim göstermektedir. Ayran örneklerinin kontrol, %1 ve %5 grubunda depolamaya bağlı olarak değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05). % 10 hidrolizat konsantrasyon eklenen ayran örneklerinde 7. ve 14. günler arasında belirlenen ABTS katyon radikal süpürme kapasiteleri arasındaki değişim istatistiksel açıdan önemsiz kabul edilirken bu fark %1 konsantrasyonunda eklenen hidrolizat örnekleri için önemli bulunmuştur.

Hidrolizat eklenen ayran örneklerinin genel olarak depolamaya bağı metal bağlama kapasitelerinde azalma gözlemlenmiştir. Örneklerin konsantrasyon miktarlarına bağı olarak 1. Gün için, kontrol - %1 ve %5- %10 örneklerinin kendi aralarındaki değışim istatistiksel olarak önemsizken, birbirleri arasındaki değışim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 7. Gün örneklerinde kontrol, %1, % 5 konsantrasyonlu örnekler arasındaki değışimde istatistiksel olarak fark bulunmazken, % 10 konsantrasyonlu ayran örneklerindeki değışim anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

4.4.3. Duyusal Değerlendirme

Yapılan çalışmada optimum koşullarda elde edilen yüksek biyoaktivite değıerlerine sahip hiderolizatların ayran örneklerine %1, %5 ve %10 oranlarında eklenmesiyle üretilen kazein hidrolizatı ilaveli örnekler tüketici beğıenine sunulmuştur. Duyusal değıerlendirme sonucunda yapılan değıerlendirmeler Tablo 4.20'de verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değıerlendirmeleri sonucunda 1.gün depolama koşullarında en çok beğıeniyi 13,02 puanla kontrol örneğı olurken, 7. ve 14.gün depolamada tüketiciler tarafından beğıenilen %1, %5 ve kontrol örnekleri arasındaki fark önemsizken, %10 kazein hidrolizatı ilaveli ayran örnekleri arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Tablo 4.20. Optimum koşullarda üretilen ve yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı eklenen ayran örneklerinin duyuşsal analiz analiz değerdendirmeleri

Örnek	Depolama (Gün)	Kıvam	Parçacıklı Yapı	Renk	Ayrana Yabancı Lezzet	Genel Beğeni
Kontrol	1	1,14±0,93 ^{a,x}	0,44±0,59 ^{a,x}	11,73±1,17 ^{a,x}	0,69±0,92 ^{a,x}	13,02±1,37 ^{a,z}
	7	0,75±0,73 ^{c,x}	0,42±0,46 ^{a,x}	12,71±1,48 ^{a,x}	0,54±0,56 ^{a,x}	13,71±1,30 ^{a,y}
	14	1,03±0,98 ^{a,x}	0,24±0,24 ^{a,x}	12,96±1,10 ^{a,x}	1,56±1,47 ^{a,x}	12,89±2,00 ^{a,y}
%1	1	1,43±1,11 ^{a,x}	0,51±0,60 ^{a,x}	11,45±1,52 ^{a,x}	0,73±0,64 ^{a,x}	11,55±1,06 ^{a,x}
	7	0,76±0,92 ^{a,x}	0,53±0,66 ^{a,x}	12,35±0,17 ^{a,x}	0,96±1,05 ^{a,x}	12,10±2,87 ^{a,y}
	14	1,01±0,94 ^{a,x}	0,28±0,27 ^{a,x}	12,68±1,32 ^{a,xy}	0,69±0,47 ^{a,x}	12,56±2,51 ^{a,y}
%5	1	1,14±0,80 ^{a,x}	0,48±0,38 ^{a,x}	10,88±1,48 ^{a,x}	1,65±1,65 ^{a,x}	10,75±2,20 ^{a,y}
	7	0,90±0,94 ^{a,x}	0,57±0,59 ^{a,x}	11,52±2,66 ^{a,x}	0,73±0,86 ^{a,x}	11,88±2,81 ^{a,y}
	14	0,98±0,92 ^{a,x}	0,24±0,24 ^{a,x}	12,41±1,37 ^{a,xy}	0,94±0,89 ^{a,x}	10,56±2,92 ^{a,y}
%10	1	1,20±1,17 ^{a,x}	0,53±0,48 ^{a,x}	11,89±0,87 ^{a,x}	10,89±1,14 ^{a,y}	4,31±1,46 ^{a,x}
	7	0,94±0,91 ^{a,x}	0,56±0,52 ^{a,x}	12,99±1,08 ^{ab,x}	10,70±0,97 ^{a,y}	5,74±2,17 ^{a,x}
	14	0,83±0,86 ^{a,x}	0,18±0,11 ^{a,x}	13,37±1,13 ^{b,z}	11,72±1,87 ^{a,y}	4,54±2,97 ^{a,x}

* Kontrol: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatı eklenmeden elde edilen ayran; %1: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %1 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; %5: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %5 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; %10: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatının %10 oranında eklenmesiyle üretilen ayran; a-c: depolama ile değışim; ^{x-t}:örnekler arasındaki değışimi ifade etmektedir (p>0,05).

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında üretimi yapılan optimum koşullarda yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizat örneklerinin ayran örnekleri içerisinde kullanılarak fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi sağlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında kazein üretimi gerçekleştirilmiş ve bu örneklerin hidrolizasyon koşulları belirlenmiştir. Homojen bir forma dönüştürülen ve hidrolizasyon koşulları belirlenen kazein örneklerinin farklı 3 endopeptidaz kullanılarak biyoaktivite değerlendirmeleri yapılmıştır. Sonuçlara göre elde edilen veriler değerlendirilmiş ve biyoaktivite değerleri en yüksek endopeptidaza TOPSİS yöntemi ile karar verilmiştir. Bu aşamada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Asit kazein elde edilmesi ve elde edilen bu asit kazeinin hidroliz açısından uygun olan, homojen ve kararlı bir çözeltiye/dispersiyona dönüştürülmesi işlemi yapılmıştır.
- Bu aşamada elde edilen asit kazeinin farklı endopeptidaz enzimleri ile farklı inkübasyon sürelerinde hidrolizlerinin gerçekleştirilmesi ve elde edilen hidrolizatlar içerisinde biyoaktivite özelliklerinin maksimize edildiği kazein hidrolizatı üretiminin gerçekleştirilmesi belirlenmiştir. Bu kapsamdaki ilk aşamada, en yüksek biyoaktivite sağlayan endopeptidazın ve inkübasyon süresinin belirlenmesi, ultrases uygulamasının etkinliği belirlenmiştir. Bu doğrultuda, üretilen örneklerin TOPSİS ile değerlendirilmesi ve en uygun örneğin seçilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda 3 farklı endopeptidaz ile (Neutrase[®], Alcalase[®] ve rTrypsin[®]), 4 farklı inkübasyon süresinde (2, 4, 8 ve 12 saat), ultrases ön işleminin varlığı ve yokluğu koşullarında kazein hidrolizatları üretilmiş ve en yüksek biyoaktiviteye sahip olan örnek TOPSİS ile belirlenmiştir (görelî yakınlık değeri 0,891).
- Biyoaktivite özelliklerini geliştirmek üzere, seçilen endopeptidaz ile birlikte iki farklı ekzopeptidazın (Flavourzyme[®] ve Protana[™] Prime) ayrı ayrı ve birlikte kullanımları da denenmiştir. Bu doğrultuda üretilen hidrolizatların analizleri de gerçekleştirilmiş ve en yüksek biyoaktiviteye sahip olan örnek TOPSİS ile belirlenmiştir (görelî yakınlık değeri

0,857). Sonuç olarak Flavourzyme® ve Protana™ Prime enzimlerinin eş değerli olarak kullanılması uygun görülmüştür.

- Yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatı üretiminde işlem koşullarının optimizasyonu aşamasında belirlenen enzimler ile optimum işlem koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, yanıt yüzey yöntemi kullanılacak ve gerekli deneysel üretim koşulları CCRD deneme planı seçilerek belirlenecektir. Faktör olarak inkübasyon süresi, enzim konsantrasyonu ve ultrases şiddeti çalışılmıştır. İnkübasyon süresi 10-20 saat, ekzopeptidaz konsantrasyonu %0-1,0 (kazein bazında) ve ultrases ön işlem süresi 0-30 dakika aralığında belirlenmiş ve üretilen hidrolizatların biyoaktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonrasında seçilen faktörlerle, bu faktörlere bağlı değişimleri istatistiksel olarak açıklanabilen (modellenebilen) biyoaktivite özelliklerinin maksimum olduğu (serbest radikal süpürme kapasitesi, metal bağlama kapasitesi, ACE inhibisyonu ve α -amilaz inhibisyonu) koşullar saptanmıştır. Bu doğrultuda, 20 saat inkübasyon süresi, %0,5 ekzopeptidaz konsantrasyonu ve 30 dakika ultrases ön işlemi koşullarında, en yüksek biyoaktivite özelliklerine sahip kazein hidrolizatının üretilebildiği belirlenmiştir. Optimizasyonda “istenilirlik fonksiyonu” değeri 0,927 olarak belirlenmiştir. Daha sonrasında, yapılan bu optimizasyonun deneysel doğrulaması da gerçekleştirilerek, gıda katkı maddesi olarak üretimleri yapılmıştır.
- Optimum koşullarda üretimleri gerçekleştirilen yüksek biyoaktiviteye sahip hidrolizatların %1, %5 ve %10 oranlarında ayran örneklerine katkı maddesi olarak eklenmiştir. Örneklerin duyusal olarak değerlendirmelerinde 1.gün depolama koşullarında en çok beğeniyi 13,02 puanla kontrol örneği olurken, 7. ve 14.gün depolamada tüketiciler tarafından beğenilen % 1, % 5 ve kontrol örnekleri bulunmuştur.

6. ÖNERİLER

Farklı Enzim Kombinasyonlarının Değerlendirilmesi: Çalışmada kullanılan enzim kombinasyonlarının dışında, yeni nesil endopeptidaz ve ekzopeptidazların biyoaktiviteye etkisi incelenebilir. Özellikle mikrobiyal kaynaklı enzimlerin potansiyeli araştırılabilir.

Ultrases Parametrelerinin Geliştirilmesi: Ultrases ön işleminin daha farklı süre ve genlik kombinasyonları ile uygulanarak biyoaktif özelliklere etkisi detaylandırılabilir. Ayrıca, kesikli ve sürekli ultrases uygulamalarının karşılaştırmalı analizi yapılabilir.

Saklama Koşullarının Etkisi: Optimum koşullarda üretilen kazein hidrolizatlarının uzun süreli depolama stabilitesi değerlendirilerek, endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeli artırılabilir.

Gıda Matrislerinde Uygulanabilirlik: Çalışmada ayran matrisi kullanılmıştır. Farklı süt ürünleri (yoğurt, kefir vb.) ve bitkisel bazlı içeceklerde kazein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklere etkisi araştırılabilir.

Biyoaktivitenin Mekanizmasının Aydınlatılması: Elde edilen hidrolizatların biyoaktif peptit profili detaylandırılarak, hangi peptitlerin spesifik olarak ACE inhibisyonu, antioksidan veya antidiyabetik aktivite gösterdiği belirlenebilir.

Endüstriyel Uygulamalar: Elde edilen kazein hidrolizatlarının gıda endüstrisinde fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanımına yönelik pilot ölçekli üretim ve uygulama çalışmaları yapılabilir.

Biyoaktif kazeinlerin sağlık üzerinde çok çeşitli olumlu etkiler sunduğu açıkça ortaya konmuştur. Antihipertansif, antimikrobiyal, immünomodülatör ve antioksidan özelliklere sahip bu peptitler, fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, kazein tüketiminin bireysel sağlık durumu ve alerji durumlarına göre dikkatlice izlenmesi gerektiği unutulmamalıdır. Gelecekte, kazein ve kazein peptitlerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi, potansiyel sağlık yararlarının daha da netleşmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Abd El-Salam, M., El-Shibiny, S., & Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6(4), 327-341.
- Akbal, S., & Öner, Z. (2021). Süt ve süt ürünlerinden elde edilen peptitlerin patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisi. *Kırklareli Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 305-322.
- Andiç, S., Ayaz, R., & Oğuz, S. (2021). A1 milk and beta-casomorphin-7. *Food and Health*, 7(2): 128–137. In.
- Ashaolu, T. J., Olatunji, O. J., Karaca, A. C., Lee, C.-C., & Jafari, S. M. (2024). Anti-obesity and anti-diabetic bioactive peptides: A comprehensive review of their sources, properties, and techno-functional challenges. *Food Research International*, 114427.
- Auestad, N., & Layman, D. K. (2021). Dairy bioactive proteins and peptides: a narrative review. *Nutrition Reviews*, 79(Supplement_2), 36-47. doi:10.1093/nutrit/nuab097
- Ay, C., & Şanlı, T. (2018). Süt Ürünlerinde Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu ve Fonksiyonel Özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 115-120. doi:10.25308/aduziraat.340581
- Azadikhah, F., Khalesi, M., Shad, E., Majdinasab, M., Razmjooei, M., & Eskandari, M. H. (2024). Inhibition of α -Amylase and Lipase by Probiotic Fermented Milk-Derived Bioactive Peptides: A Comprehensive in vitro Investigation. *LWT*, 117208.
- Barać, M., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., Vučić, T., Smiljanić, M., & Žilić, S. (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo*, 66(3), 187-197.
- Beermann, C., & Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food & function*, 4(2), 185-199.
- Bell, S. J., Grochoski, G. T., & Clarke, A. J. (2006). Health implications of milk containing β -casein with the A2 genetic variant. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 93-100.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139-150.

- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2017). Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(3), 566-578.
- Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E., & Banerjee, R. K. (2003). A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10993-11001.
- Bougherra, F., Dilmi-Bouras, A., Balti, R., Przybylski, R., Adoui, F., Elhameur, H., . . . Naima, N. (2017). Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16. *Journal of Functional Foods*, 32, 112-122.
- Bounous, G., & Gold, P. (1991). The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med*, 14(4), 296-309.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bulca, S., & Güvenç, B. (2020). Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptitler, Antimikrobiyal Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(1), 158-164. doi:10.24925/turjaf.v8i1.158-164.2886
- Çam, M., Erbay, Z., Kelebek, H., Kendirci, P., & Baş, D. (2018). Olgun Beyaz Peynir Lezzetine Sahip Mikroenkapsüle Enzim Modifiye Peynir Tozu Üretimi.
- Çam, M., & İçyer, N. C. (2015). Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *Journal of food science and technology*, 52, 1489-1497.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry*, 40(2), 450-458.
- Çekiç, S. D., Demir, A., Başkan, K. S., Tütem, E., & Apak, R. (2015). Determination of total antioxidant capacity of milk by CUPRAC and ABTS methods with separate characterisation of milk protein fractions. *Journal of Dairy Research*, 82(2), 177-184.
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, 10(11). doi:10.3390/nu10111738

- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L., & Åkesson, B. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13(12), 927-935.
- Chew, L. Y., Toh, G. T., & Ismail, A. (2019). Application of proteases for the production of bioactive peptides. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 247-261): Elsevier.
- Chourasia, R., Chiring Phukon, L., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Bioactive peptides in fermented foods and their application: a critical review. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 3(1), 88-109. doi:10.1007/s43393-022-00125-4
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219-1227.
- Clare, D., Catignani, G., & Swaisgood, H. (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1239-1255.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195.
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., . . . 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(12), 2247-2254.
- De Moreno de LeBlanc, A., & Perdigon, G. (2005). Reduction of b-Glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell*, 29(1), 15-24.
- De Simone, C., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., . . . Ferranti, P. (2009). Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 15(3), 251-258.
- del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.
- Denizli, A., & Yavuz, H. (2011). Kan liflerinin biyokimyası. *Tübitak Bilim ve Teknik dergisi, Nisan, 2011*, 64-67.

- Dent, M., O'Hagan, S., Braun, W., Schaetti, P., Marburger, A., & Vogel, O. (2007). A 90-day subchronic toxicity study and reproductive toxicity studies on ACE-inhibiting lactotripeptide. *Food and Chemical Toxicology*, 45(8), 1468-1477.
- Dinç, B. H., & Kahyaoğlu, D. T. (2021). Kastamonu'da Tüketilen Ticari Ayranların Bazı Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 208-216.
- Diplock, A. T., & Action, E. C. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1-S27. doi:10.1017/s0007114599000471
- Doorten, A. P.-S., Vd Wiel, J., & Jonker, D. (2009). Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 55-61.
- Drummond, E., Flynn, S., Whelan, H., Nongonierma, A. B., Holton, T. r. s. A., Robinson, A., ... Gibney, E. R. (2018). Casein hydrolysate with glycemic control properties: Evidence from cells, animal models, and humans. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 66(17), 4352-4363.
- Duffuler, P., Bhullar, K. S., de Campos Zani, S. C., & Wu, J. (2022). Bioactive peptides: From basic research to clinical trials and commercialization. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 70(12), 3585-3595.
- Ebringer, L., Ferencík, M., & Krajčovič, J. (2008). Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. *Folia microbiologica*, 53, 378-394.
- Erbay, Z., & Icier, F. (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of food engineering*, 91(4), 533-541.
- Fekete, A. A., Giromini, C., Chatzidiakou, Y., Givens, D. I., & Lovegrove, J. A. (2016). Whey protein lowers blood pressure and improves endothelial function and lipid biomarkers in adults with prehypertension and mild hypertension: results from the chronic Whey2Go randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 104(6), 1534-1544.
- Fiat, A.-M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D., & Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 301-310.

- FitzGerald, R., & Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B* (pp. 675-698): Springer.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.
- Gil-Rodríguez, A. M., & Beresford, T. P. (2019). Lipase inhibitory activity of skim milk fermented with different strains of lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 60, 103413.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherfurd, K., & Cross, M. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 111-117.
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.
- 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.
- Goldman, A. S., & Goldblum, R. M. (2007). Defense agents in milk: A. defense agents in human milk. *Handbook of milk composition*, 727.
- Hammershøj, M., Hougaard, A. B., Vestergaard, J. S., Poulsen, O., & Ipsen, R. H. (2010). Instant infusion pasteurisation of bovine milk. II. Effects on indigenous milk enzymes activity and whey protein denaturation. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 197-208.
- Haney, E. F., & Hancock, R. E. (2013). Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Peptide Science*, 100(6), 572-583.
- Haq, M. R. U., Kapila, R., & Saliganti, V. (2014). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *Journal of Functional Foods*, 8, 150-160.
- Haque, E., Chand, R., & Kapila, S. (2008). Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Reviews International*, 25(1), 28-43. doi:10.1080/87559120802458198
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.

- He, J., Wofford, M. R., Reynolds, K., Chen, J., Chen, C.-S., Myers, L., . . . Whelton, P. K. (2011). Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Circulation*, 124(5), 589-595.
- Hilario, M. C., Puga, C. D., Ocana, A. N., & Romo, F. P.-G. (2010). Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*, 77(1), 20-26.
- Himmetagaoglu, A. B., Erbay, Z., & Cam, M. (2018). Production of microencapsulated cream: Impact of wall materials and their ratio. *International Dairy Journal*, 83, 20-27.
- Hirota, T., Nonaka, A., Matsushita, A., Uchida, N., Ohki, K., Asakura, M., & Kitakaze, M. (2011). Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. *Heart and vessels*, 26, 549-556.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2022). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, 209-232.
- Hwang, C.-L., Yoon, K., Hwang, C.-L., & Yoon, K. (1981). Methods for multiple attribute decision making. *Multiple attribute decision making: methods and applications a state-of-the-art survey*, 58-191.
- Inoue, K., Gotou, T., Kitajima, H., Mizuno, S., Nakazawa, T., & Yamamoto, N. (2009). Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 111-115.
- Jakopović, K. L., Barukčić, I., & Božanić, R. (2019). Bioactive components derived from bovine milk. *Mljekarstvo*, 69(3), 151-161.
- Kamali Alamdari, E., & Ehsani, M. (2017). Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.
- Kara, S., & Köse, Ş. (2020). Geleneksel Yöntemle Üretilen Otlı Peynirlerin Bazı Kalite Özelliklerinin Ve Biyoaktivitesinin Belirlenmesi. *Gıda*, 45(5), 942-953.
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J Food Sci Technol*, 56(2), 535-547. doi:10.1007/s13197-018-3549-4
- Kasal, T., Honda, T., & Kiriya, S. (1992). Casein phosphopeptides (CPP) in feces of rats fed casein diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(7), 1150-1151.

- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American journal of clinical nutrition*, 77(5), 1261-1268.
- Keri Marshall, N. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative medicine review*, 9(2), 136-156.
- Kett, A., Bruen, C., O'Halloran, F., Chaurin, V., Lawlor, P., O'Mahony, J., . . . Fenelon, M. (2012). The effect of α -or β -casein addition to waxy maize starch on postprandial levels of glucose, insulin, and incretin hormones in pigs as a model for humans. *Food & Nutrition Research*, 56(1), 7989.
- Kılıç, H. N., & Firincioğlu, S. Y. (2021). The Characteristics of A1-A2 β -Caseins in Milk and Their Effects on Human Health. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(11), 1973-1979.
- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Kim, D. Y., Yoo, J. S., Cho, Y. A., Yoon, H. S., & Kim, C.-H. (2021). Biological potential of novel specific casein-derived peptides. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 39(1), 36-50.
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9. doi:10.1016/j.jff.2010.01.003
- Kim, Y.-M., Wang, M.-H., & Rhee, H.-I. (2004). A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate research*, 339(3), 715-717.
- Kim, Y. E., Kim, J. W., Cheon, S., Nam, M. S., & Kim, K. K. (2019). Alpha-Casein and beta-lactoglobulin from cow milk exhibit antioxidant activity: a plausible link to antiaging effects. *Journal of food science*, 84(11), 3083-3090.
- Kınık, Ö., & Gürsoy, O. (2002). Süt Proteinleri Kaynaklı Biyoaktif Peptiler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195-203.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323.

- Knyazeva, E. L., Grishchenko, V. M., Fadeev, R. S., Akatov, V. S., Permyakov, S. E., & Permyakov, E. A. (2008). Who is Mr. HAMLET? Interaction of human α -lactalbumin with monomeric oleic acid. *Biochemistry*, 47(49), 13127-13137.
- Koçak, C., Avşar, Y. K., & Tamuçay, B. (2006). A comparative study on the production methods of ayran.
- Köksoy, A. (2003). *Ayranın Yapısal Özelliklerinin İyileştirilmesi*. Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79-88. doi:10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187. doi:10.1016/j.jff.2009.01.007
- Korhonen, H., & Marnila, P. (2006). Bovine milk antibodies for protection against microbial human diseases.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1297-1308.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.012
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. *Handbook of food products manufacturing—Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables*, 5-37.
- Krissansen, G. W. (2007). Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(6), 713S-723S.
- Kumar, D., Verma, A. K., Chatli, M. K., Singh, R., Kumar, P., Mehta, N., & Malav, O. P. (2016). Camel milk: Alternative milk for human consumption and its health benefits. *Nutrition & Food Science*, 46(2), 217-227.
- 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(7), 469-486.
- Li, Q., Xu, J., Chen, Y., Xie, W., Mei, G., Li, X., . . . Yang, G. (2022). Chemical constituents from the seeds of *Nigella glandulifera* and their hypoglycemic activities. *RSC advances*, 12(30), 19445-19451.
- Lillefosse, H. H., Tastesen, H. S., Du, Z.-Y., Ditlev, D. B., Thorsen, F. A., Madsen, L., . . . Liaset, B. (2013). Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. *The Journal of nutrition*, 143(9), 1367-1375.

- Liu, H., Chen, W.-L., & Mao, S. (2007). Antioxidant nature of bovine milk β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 547-555.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in food science & technology*, 79, 136-147.
- Madadlou, A., Sheehan, D., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, M. E. (2011). Ultrasound-assisted generation of ACE-inhibitory peptides from casein hydrolyzed with nanoencapsulated protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 2112-2116.
- Magalhães, I. S., Guimarães, A. D. B., Tribst, A. A. L., de Oliveira, E. B., & Júnior, B. R. d. C. L. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Research International*, 157, 111310.
- Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in food science & technology*, 80, 187-198. doi:10.1016/j.tifs.2018.08.013
- Mazorra-Manzano, M., Ramírez-Suarez, J., & Yada, R. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2147-2163.
- McCann, K., Shiell, B., Michalski, W., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., & Coventry, M. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. *International Dairy Journal*, 16(4), 316-323.
- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food chemistry*, 115(1), 193-199.
- Megrous, S., Al-Dalali, S., Zhao, X., Chen, C., Cao, Y., Bourouis, I., . . . Yang, Z. (2020). Evaluation of antidiabetic activities of casein hydrolysates by a bacillus metalloendopeptidase. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 2519-2527.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current medicinal chemistry*, 12(16), 1905-1919.
- Meisel, H., & Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in food science & technology*, 1, 41-43.

- Miguel, M., Contreras, M., Recio, I., & Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food chemistry*, 112(1), 211-214.
- Miguel, M., Muguerza, B., Sánchez, E., Delgado, M., Recio, I., Ramos, M., & Aleixandre, M. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *British Journal of Nutrition*, 94(1), 36-43.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miluchová, M., Gábor, M., Trakovická, A., & Hanusová, J. (2016). Bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta fytotechnica et Zootechnica*, 19(5), 48-51.
- Mishra, V. K., Mohammad, G., Jha, A., & Mohammad, G. (2008). Immunomodulation and anticancer potentials of yogurt probiotic. *EXCLI Journal*, 7(1), 177-184.
- Mokhtari, R., Rezaei, M., Kazemi Fard, M., & Dirandeh, E. (2023). Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Casein-Derived Bioactive Peptides Using Trypsin Enzyme. *Journal of Food Quality*, 2023(1), 1792917.
- Moslehishad, M., Ehsani, M. R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A. N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., . . . Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16(1), 61-69.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons.
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., . . . Kuwata, T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1), 11-17.

- Naji, A. M., & Çam, M. (2024). Comparative analysis of milk casein hydrolysates from cow, water buffalo, goat and sheep: effects of flavourzyme and neutrase on formation of bioactive peptides. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-15.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., & Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19(3), 155-165.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1909-1917.
- 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.
- Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2006). Effect of cationic flaxseed protein hydrolysate fractions on the in vitro structure and activity of calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase. *Molecular nutrition & food research*, 50(10), 958-966.
- Özdemir, S., Edebalı, E., & Özdemir, C. (2021). Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptitler ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(1), 268-280.
- Ozen, A. E., Pons, A., & Tur, J. A. (2012). Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutr Rev*, 70(8), 472-481. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00492.x
- Öztürk, H. İ., & Akın, N. (2021). Gıda Proteinlerinden Elde Edilen Biyoaktif Peptidler: Fonksiyonları Ve Sağlık Üzerinde Oynadığı Rollere Göre Sınıflandırılması. *Gıda*, 46(1), 42-52.
- Panchaud, A., Affolter, M., & Kussmann, M. (2012). Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of proteomics*, 75(12), 3546-3559.
- Park, Y. W. (1990). Nutrient profiles of commercial goat milk cheeses manufactured in the United States. *Journal of Dairy Science*, 73(11), 3059-3067.
- Park, Y. W. (2009a). Bioactive components in goat milk. *Bioactive components in milk and dairy products*, 4381.

- Park, Y. W. (2009b). Overview of bioactive components in milk and dairy products. *Bioactive Com. Milk Dairy Prod.*, 1–12. In.
- Patır, B., Öksüztepe, G., Şeker, P., & Dikici, A. (2006). Elazığ'da tüketime sunulan açık ayranlar ile orijinal ambalajlı ayranların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 20(5), 357-363.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). bifidobacteria as probiotic agents–physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in food science & technology*, 11(9-10), 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325-331.
- 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.
- Playne, M. J., Bennett, L., & Smithers, G. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 242-264.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., & Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.
- Rao, P. S., Bajaj, R., & Mann, B. (2020). Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate. *Journal of food science and technology*, 57, 4562-4575.
- Rawlings, N. D., & Salvesen, G. (2013). *Handbook of proteolytic enzymes*. Retrieved from
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(1), 295-302.

- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobetti, M., Carbonara, T., De Bari, M., & Zambonin, P. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360.
- Sakkas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E., & Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food chemistry*, 159, 293-301.
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., & Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170-181.
- Şanlıdere, H., & Öner, Z. (2006). Süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve fonksiyonları. *Gıda*, 31(6).
- Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., . . . Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of medicinal food*, 8(4), 423-430.
- Sarode, A., Sawale, P., Khedkar, C., Kalyankar, S., & Pawshe, R. (2016). Casein and caseinate: methods of manufacture.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., & Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 77(2), 326-330.
- Shah, N. P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 3-10.
- Shalaby, S. M., Zakora, M., & Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73(2), 178-186.
- Shu, G., Zhang, B., Zhang, Q., Wan, H., & Li, H. (2016). Effect of temperature, pH, enzyme to substrate ratio, substrate concentration and time on the antioxidative activity of hydrolysates from goat milk casein by alcalase. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 20(2), 29-38.
- 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 & Technology*, 90(1), 47-73.

- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*, 51(3), 456-467. doi:10.1016/j.appet.2008.05.060
- Smacchi, E., & Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17(2), 129-141. doi:10.1006/fmic.1999.0302
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., & Mikelsaar, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2017-2023.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(3), 128-131.
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S., Aleem, M., & Abbas, M. (2018). Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(1), 105-115.
- Swinburn, B. (2004). Beta casein A1 and A2 in milk and human health. *Report to New Zealand Food Safety Authority*, 1-43.
- Tan, Y., Chang, S. K., & Zhang, Y. (2017). Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food chemistry*, 214, 259-268.
- Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., & Hammami, R. (2014). Antimicrobial peptides of dairy proteins: from fundamental to applications. *Food Reviews International*, 30(2), 134-154.
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., & Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706-714.
- Tidona, F., Criscione, A., Guastella, A. M., Zuccaro, A., Bordonaro, S., & Marletta, D. (2009). Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science*, 8(3), 315-340.
- Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petrón, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (< 3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT-Food science and Technology*, 57(1), 359-365.

- Tirelli, A., De Noni, I., & Resmini, P. (2000). Bioactive Peptides in Milk Products. *Journal of Food Technology in Africa*, 5(1).
- Tome, D., & Ledoux, N. (1998). Nutritional and physiological role of milk protein components.
- Tu, M., Liu, H., Cheng, S., Xu, Z., Wang, L.-S., & Du, M. (2020). Identification and analysis of transepithelial transport properties of casein peptides with anticoagulant and ACE inhibitory activities. *Food Research International*, 138, 109764.
- Tu, M., Qiao, X., Wang, C., Liu, H., Cheng, S., Xu, Z., & Du, M. (2021). In vitro and in silico analysis of dual-function peptides derived from casein hydrolysate. *Food Science and Human Wellness*, 10(1), 32-37.
- Tu, M., Wang, C., Chen, C., Zhang, R., Liu, H., Lu, W., . . . Du, M. (2018). Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Food chemistry*, 256, 98-104.
- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., . . . Lv, J. (2013). Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(11), 2250-2257.
- Ünal, M. Ü., Şener, A., & Cemek, K. (2018). Bıyoaktif Peptitlerin Sağlık Üzerine Etkileri. *Gıda*, 43(6), 930-942. doi:10.15237/gida.GD18048
- Wang, C., Luo, D., Zheng, L., & Zhao, M. (2024). Anti-diabetic mechanism and potential bioactive peptides of casein hydrolysates in STZ/HFD-induced diabetic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(5), 2947-2958.
- Wharton, S., Lau, D. C., Vallis, M., Sharma, A. M., Biertho, L., Campbell-Scherer, D., . . . Boulé, N. (2020). Obesity in adults: a clinical practice guideline. *Cmaj*, 192(31), E875-E891.
- Yadavalli, S. S., Carey, J. N., Leibman, R. S., Chen, A. I., Stern, A. M., Roggiani, M., . . . Goulain, M. (2016). Antimicrobial peptides trigger a division block in Escherichia coli through stimulation of a signalling system. *Nature communications*, 7(1), 12340.
- Yalçın, E., & Rakıcioğlu, N. (2020). Biyoaktif besin peptitleri ve sağlık üzerine etkileri. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 241-246.
- Yang, J., Koga, Y., Nakano, H., & Yamane, T. (2002). Modifying the chain-length selectivity of the lipase from Burkholderia cepacia KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. *Protein Engineering*, 15(2), 147-152.

- Yang, N., Strøm, M. B., Mekonnen, S. M., Svendsen, J. S., & Rekdal, Ø. (2004). The effects of shortening lactoferrin derived peptides against tumour cells, bacteria and normal human cells. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 10(1), 37-46.
- Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., . . . Takahata, K. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors*, 12(1-4), 143-146.
- Zhang, M., Yang Jr, F., Yang, F., Chen, J., Zheng, C.-Y., & Liang, Y. (2009). Cytotoxic aggregates of α -lactalbumin induced by unsaturated fatty acid induce apoptosis in tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, 180(2), 131-142.
- Zhang, R., Pang, X., Lu, J., Liu, L., Zhang, S., & Lv, J. (2018). Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47, 10-16.
- Zhang, X., & Beynen, A. C. (1993). Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *British Journal of Nutrition*, 70(1), 139-146.
- Zhou, S., Xu, T., Zhang, X., Luo, J., An, P., & Luo, Y. (2022). Effect of casein hydrolysate on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, 14(19), 4207.

EKLER

Şekil Ek 1: Duyusal değerlendirilmede kullanılan tüketici değerlendirme skalası

A)YAPI ÖZELLİKLERİ	
KIVAM;	
Akışkan	Yoğun
PARÇACIKLI/PIHTILI YAPİ;	
Yok	Aşırı
RENK;	
Grimsi	Kar Beyazı
B)TAT ÖZELLİKLERİ	
AYRANA YABANCI LEZZET (bu lezzeti tanımlayınız);	
Yok	Aşırı
GENEL BEĞENİ;	
Çok kötü	Mükemmel