



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI TEKNİKLERLE ÜRETİLEN MARAŞ  
TARHANALARINDAKİ BİYOAKTİF PEPTİTLERİN  
BELİRLENMESİ**

**DOĞANAY YÜKSEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2018**

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI TEKNİKLERLE ÜRETİLEN MARAŞ  
TARHANALARINDAKİ BİYOAKTİF PEPTİTLERİN  
BELİRLENMESİ**

**DOĞANAY YÜKSEL**

Bu tez,  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS  
derecesi için hazırlanmıştır.

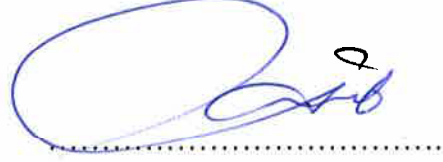
**KAHRAMANMARAŞ 2018**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Doğanay YÜKSEL tarafından hazırlanan “Farklı Tekniklerle Üretilen Maraş Tarhanalarındaki Biyoaktif Peptitlerin Belirlenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 21/12/2018 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Levent İNANÇ (DANIŞMAN)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi



Prof. Dr. Özlem TURGAY (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Kurban YAŞAR (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Doğanay YÜKSEL



Bu çalışma KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: 2017 / 7-162 YLS

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

# FARKLI TEKNİKLERLE ÜRETİLEN MARAŞ TARHANALARINDAKİ BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ

Doğanay YÜKSEL

## ÖZET

Bu çalışmada geleneksel yöntem ve direkt fermentasyon yöntemi olmak üzere iki farklı teknikle üretilen Maraş tarhanası ve tarhanaların ana bileşenleri olan buğday (dövme) ve yoğurdun RP-HPLC’de peptit profilleri kıyaslanmış ve Q-TOF LC/MS’de peptit içerikleri araştırılmıştır. Kütle spektrometresi verileri PEAKS Studio (versiyon 8.5) programında incelenerek tespit edilen peptitlerin BIOPEP veri setinde fizyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. BIOPEP veri setinde yer almayan peptitler UniProt KB veri setinde taranarak peptitlerin kaynakları incelenmiş ve olası fizyolojik aktiviteleri için literatür taraması yapılmıştır.

Kütle spektrometresi verilerine göre geleneksel tarhana örneklerinde 34 farklı, direkt fermente tarhana örneklerinde ise 50 farklı peptit zinciri tespit edilmiştir. BIOPEP ve UniPROT veri setleri ile yapılan karşılaştırma sonucunda toplamda 8 ACE inhibitör peptit (IPAVFK-AVPYPQR-LIVTQ-EMPFK-FR-VR-RL-LR), 3 antioksidant peptit (VLPVPQK-AVPYPQR-LLR), 1 antibakteriyal peptit (IPAVFK), 4 DPP IV inhibitör peptit (IPAVFK-FR-VR-RL), 1 renin inhibitör peptit (LR) zinciri tespit edilmiştir.

Yoğurt örneğinde saptanan 19 farklı peptit zincirinden iki tanesi (VLPVPQK, EAMAPK) tarhana örneklerinde de tespit edilmiştir. VLPVPQK peptiti BIOPEP veri setinde antioksidatif peptit olarak kayıtlıdır. Dövme örneğinde 23 adet peptit tespit edilmiştir. Bunların içinden LVVPPK peptiti direkt fermente tarhana örneğinde de saptanmıştır. Yoğurt ve dövme örneklerinin her ikisinde de ortak bulunan peptit tespit edilememiştir.

Literatür taraması sonucunda veri setlerinde yer almayan EAMAPK peptit zincirinin antioksidant aktivite, IIVTQTMK peptit zincirinin ACE inhibitör aktivite gösterme potansiyeli taşıdıkları anlaşılmıştır. Bununla beraber LPAVFK, LPGLKF, LLSLGA, LVVPPK peptit zincirlerinin amino asit dizilimi ve türleri göz önüne alındığında antimikrobiyal aktivite göstermeye aday peptit zincirleri oldukları sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Maraş Tarhanası, Biyoaktif Peptit, Yoğurt, Buğday

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı / 2018

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Levent İNANÇ

Sayfa sayısı: 68



# **DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDES IN THE MARAS TARHANA PRODUCED BY DIFFERENT TECHNIQUES**

**Doğanay YÜKSEL**

## **SUMMARY**

In this study, two different techniques namely traditional method and direct fermentation method were used to produce Maraş tarhana. Peptide profiles of tarhana and yogurt samples were compared by RP-HPLC method. Also, peptide contents of these samples were investigated by Q-TOF LC/MS. Mass spectrometry data were analyzed in PEAKS Studio (version 8.5) software and the physiological activities of the peptides were investigated in BIOPEP database. Peptides that were not included in the BIOPEP database were screened in the UniProt KB protein database to investigate the sources of the peptides and to search the literature for their possible physiological activities.

According to mass spectrometry data, 34 and 50 different peptide chains were determined in the traditional and direct fermentation tarhana samples, respectively. Detected peptide chains were screened in the BIOPEP peptide database and the UniProt KB protein database. A total of eight ACE inhibitor peptides (IPAVFK-AVPYPQR-LIVTQ-EMPFK-FR-VR-RL-LR), 3 antioxidant peptides (VLPVPQK-AVPYPQR-LLR), 1 antibacterial peptide (IPAVFK), 4 DPP IV inhibitor peptides (IPAVFK-FR-VR-RL), 1 renin inhibitor peptide (LR) chain identified according to the databases.

19 different peptide chain were detected in the yogurt sample. Two of them (VLPVPQK, EAMAPK) were also detected in tarhana samples. VLPVPQK peptide chain has been registered as antioxidant peptide in the BIOPEP database. 23 peptides were detected in wheat samples. One of them (LVVPPK) was also detected in the direct fermented tarhana sample. However no common peptide was detected in yoghurt and wheat sample.

As a result of the literature review, it was found that EAMAPK peptide chain, which is not included in the databases, has antioxidant activity and the IIVTQTMK peptide chain has the potential to show ACE inhibitory activity. In addition it has been concluded that LPAVFK, LPGLKF, LLSLGA, and LVVPPK peptides have potential to show antimicrobial activity considering the amino acid sequence and types.

**Key Words:** Maras Tarhana, Bioactive Peptide, Yoghurt, Wheat

Kahramanmaraş Sütçü İmam University  
Institute of Science and Technology  
Food Engineering Field of Study / 2018

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Ahmet Levent İNANÇ

Page number: 68





## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında sabrını ve ilgisini eksik etmeyen, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Levent İNANÇ'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimleri ve bilgileriyle beni aydınlatan, tez yazım sürecinde her türlü kolaylığı sağlayan değerli Gıda Mühendisliği Bölümü hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Analizlerimde bana yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Elif Sena KIRMIZIKAYA'ya bana ayırdığı zamandan ötürü teşekkür ederim. Değerli çalışma arkadaşlarım Sayın Elif ÇELİK, Hazel Dilşad TATAR ve Sermet AYMAN'a desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Tüm bu süreçte fikir alışverişinde bulunduğum değerli dostum Sayın Hakkı Yasin ODABAŞOĞLU'na ilgisinden ötürü teşekkür ederim.

Maddi manevi her konuda yanımda olan sevgili annem ve babam Sayın Türkan YÜKSEL'e, Veysel YÜKSEL'e ve neşesi, enerjisiyle daima bana güç veren canım kardeşim Sayın Melike YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Beni her zaman anlayışla karşılayan, destekleyen ve hiçbir konuda yalnız bırakmayan, fedakarlığı ve sevgisiyle yoluma ışık tutan, hayat arkadaşım, sevgili eşim Huriye YÜKSEL'e en içten duygularıyla sonsuz teşekkürler.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	15
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	17
2.1. Biyoaktif Peptitler .....	17
2.2. Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonları .....	22
2.2.1. Antioksidatif Etki .....	22
2.2.2. Antihipertansif Etki .....	24
2.2.3. Antimikrobiyal Etki .....	27
2.2.4. Mineral Bağlayıcı Etki .....	28
2.2.5. Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etki .....	29
2.2.6. Opioid Etki .....	29
2.2.7. Antitrombotik Etki .....	30
2.3. Gıda Kaynaklı Biyoaktif Peptitlerin In Silico Analizleri .....	30
2.4. Peaks Studio ve BIOPEP Programları .....	31
3. MATERYAL VE METOT .....	33
3.1. Materyal .....	33
3.2. Metot .....	33
3.2.1. Yoğurt yapımı .....	33
3.2.2. Dövmenin pişirilmesi .....	33
3.2.3. Tarhana yapımı .....	33
3.2.4. Analizler .....	35
3.2.4.1. Tarhana proteinlerinin in-silico sindiriminin modellenmesi .....	35
3.2.4.2. Sıvı kromatografisinde peptit profili analizi .....	35
3.2.4.3. Kütle Spektrometresi Analizi .....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	39
4.1. Tarhana Proteinlerinin In-silico Sindirimi .....	39

4.2. Sıvı Kromatografisinde Peptit Profili Analizi .....	44
4.3. Kütle Spektrometresi Analizi.....	49
4.3.1. Dövme hidrolizatı.....	49
4.3.2. Yoğurt hidrolizatı .....	50
4.3.3. Tarhana hidrolizatları .....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	58
KAYNAKLAR.....	60



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Tarhana hamuru.....	34
Şekil 3.2. Tarhana hamurunun kurutulması.....	34
Şekil 3.3. SPE vakum manifoldu ve SPE (katı faz ekstraksiyon) kolonları.....	36
Şekil 4.1. Yoğurt proteinleri in silico sindiriminin BIOPEP programındaki sonuç ekranı.....	40
Şekil 4.2. Buğday proteinleri in silico sindiriminin BIOPEP programındaki sonuç ekranı.....	41
Şekil 4.3. Yoğurt ve dövme örneklerinin 214 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramları.....	44
Şekil 4.4. Geleneksel tarhana, yoğurt ve dövmenin kromatogramları.....	45
Şekil 4.5. Direkt fermente tarhana, yoğurt ve dövmenin kromatogramları .....	46
Şekil 4.6. Geleneksel tarhana ve direkt fermente tarhana örneklerine ait kromatogramların karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.7. Geleneksel ve direkt fermente tarhanaların pepsin (pH:2) ve tripsin (pH:8) hidrolizatlarının kromatogramları.....	47
Şekil 4.8.a. Direkt fermente tarhananın pepsin-tripsin hidrolizatının kromatogramı.....	48
Şekil 4.8.b. Geleneksel tarhananın pepsin-tripsin hidrolizatının kromatogramı...	48
Şekil 4.9. Tarhana, yoğurt ve dövme hidrolizatların ortak bulunan peptitler.....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Biyoaktif peptitlerin öncül proteinleri ve sergiledikleri fizyolojik aktiviteleri.....	18
Çizelge 2.2. Peptit zincirinde bulunan amino asitlere göre oluşturulan puan tablosu.....	24
Çizelge 2.3. ACE inhibitör peptit içeren bazı ticari ürünler.....	25
Çizelge 3.1. Mobil faz gradient programı.....	36
Çizelge 4.1. Yoğurt proteinlerinin pepsin-tripsin enzimleri ile in silico hidrolizi	42
Çizelge 4.2. Buğday proteinlerinin pepsin-tripsin enzimleri ile in silico hidrolizi.....	43
Çizelge 4.3. Dövme hidrolizatının kütle spektrometresi sonuçları.....	49
Çizelge 4.4. Dövme hidrolizatının kütle spektrometresi de-novo sonuçları.....	50
Çizelge 4.5. Yoğurt hidrolizatının kütle spektrometresi sonuçları.....	50
Çizelge 4.6. Yoğurt hidrolizatının kütle spektrometresi de-novo sonuçları.....	51
Çizelge 4.7. Kütle spektrometresi verilerinin PEAKS Studio programında değerlendirilmesi.....	52
Çizelge 4.8. PEAKS Studio programı çıktılarının BIOPEP veri setindeki tarama sonuçları.....	53
Çizelge 4.9. PEAKS Studio programının de-novo sekanslama sonuçları.....	54
Çizelge 4.10. PEAKS Studio de-novo sekanslama sonuçlarının BIOPEP veri setindeki tarama sonuçları.....	55
Çizelge 4.11. Tarhana proteinlerinin in silico ve deneysel hidroliz sonuçlarının kıyaslanması.....	56

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS: 2,2'-azino-bis-3-etilbezotiazolin-6-sulfonat

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

AMP: Antimikrobiyal peptit

BAEE: N- $\alpha$ -Benzol-L-arginin etil ester

CampDE inhibitör: calmodulin-bağımlı siklik nükleotit fosfodiesteraz inhibitör

Da: Dalton

DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

DVS kültür: Direkt aşılama kültürü

Glutenin HMW: Yüksek molekül ağırlıklı glütenin

Glutenin LMW: Düşük molekül ağırlıklı glütenin

IC<sub>50</sub>: % 50 azalmaya yol açan inhibitör dozu

IgA: İmmüoglobulin A

IgG: İmmüoglobulin G

KFP: Kazeinofosfopeptit

MF-WPI: Mikro-filtre peynir altı suyu protein izolatu

MIC: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

NK cell: Doğal öldürücü hücre (lemfosit hücresi)

OPA: o-Fitalaldehit

Q-TOF LC/MS: Sıvı kromatografisi / uçuş zamanlı kütle spektrometresi

RP-HPLC: Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi

SPE: Katı faz ekstraksiyon

Tris-HCl: 2-amino-2-(hidroksimetil) propan-1,3-diol hidroklorit

WSE: Suda çözünebilir ekstrakt

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM)**

A: Alanin

C: Sistein

D: Aspartik asit

E: Glutamik asit

F: Fenilalanin

G: Glisin

H: Histidin

I: İzolösin

L: Lösin

M: Metiyonin

N: Asparagin

P: Prolin

Q: Glutamin

R: Arginin

S: Serin

T: Trionin

V: Valin

W: Triptofan

Y: Tirozin

## 1. GİRİŞ

Besleyici özelliği, uzun süreli ve kolay muhafaza edilebilmesiyle yaygın olarak üretilip tüketilen fermente bir gıda maddesi olan tarhananın diyetimizde önemli bir yeri vardır. Tarhana ülkemizin köklü mutfak kültürü içinde yer edinen iyi bir protein, vitamin, mineral kaynağı olduğu için yetişkin ve çocukların beslenmesinde yaygın olarak kullanılan geleneksel gıdalardan biridir (Tamer ve ark., 2007; Özdemir ve ark., 2012). Tarhana bileşiminde hem hayvansal kaynaklı hem de bitkisel kaynaklı proteinler bulunmaktadır. Bu nedenle tarhana protein çeşitliliği açısından zengin bir gıda maddesidir. Tarhana laktik asit fermantasyonu ile üretilen bir besindir. Fermantasyon, en eski ve en ekonomik besin üretim ve muhafaza yöntemlerinden biridir. Fermantasyon ayrıca taşımak için materyalin hacmini azaltmak, arzu edilmeyen bileşenleri parçalamak, besin değerini artırmak, pişirme için gereken enerjiyi azaltmak ve güvenilir ürün yapmak için doğal bir yoldur (Dağlıoğlu, 2000). Biyokimyasal önemi açısından fermantasyon temelde mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürmek için gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonlarıdır. Fermantasyonda büyük moleküller, polimerler alt birimlerine ve yapı taşlarına parçalanır. Tarhana fermantasyonu esnasında ortamdaki protein, karbonhidrat ve yağ gibi öğelerin bakteri kültürleri tarafından ön sindirime tabi tutulmaları, tarhananın daha kolay sindirilebilmesi ve daha besleyici özellik kazanmasına yol açmaktadır. Ön sindirim sonucu birçok molekül alt birimlerine parçalanır. Proteinlerin parçalanması sonucunda farklı uzunluklarda peptit zincirleri ortaya çıkar. Bu şekilde protein yapısı içinde inaktif olan ancak mikroorganizmaların enzimatik aktivitesi (hidroliz) sonucunda açığa çıktığında önemli fizyolojik aktiviteler sergileyen amino asit zincirleri (peptit), biyoaktif peptit veya fonksiyonel peptit olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif peptitler proteinleri oluşturan aminoasit zincirlerinin içine kodlanmışlardır ve genellikle 3-20 amino asitten oluşan kısa peptit zincirleridir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

Günümüzde özellikle süt proteinleri kaynaklı, farklı fizyolojik etkiler (tansiyon düşürme, antimikrobiyal, antioksidant, mineral bağlama, bağışıklık sistemini uyarma) gösteren çok sayıda biyoaktif peptit tanımlanmıştır. Bununla beraber süt tek kaynak değildir. Literatürde tahıl ve kırmızı et proteinlerinin dizilerinde de fizyolojik aktivite taşıyan peptitlerin bulunduğu belirtilmektedir. Bu bağlamda tarhananın hem süt hem de tahıl proteinleri içermesi açısından önemli bir biyoaktif peptit kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bir fermente gıda olarak tarhana, bakteriler tarafından



büyük protein moleküllerinin kısa peptit zincirlerine parçalandığı önemli bir matriks olarak değerlendirilmektedir. Bu iki faktör tarhanayı biyoaktif peptitler açısından incelenmeye değer bir konu haline getirmektedir. Öte yandan literatür incelemesi sonucunda tarhana yapısında bulunması muhtemel peptitler üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber tarhana benzeri ürünler ve tarhananın ana bileşenleri olan yoğurt ve buğday (dövme) ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Tarhananın ana bileşenlerinden birisi olan yoğurdun yapısında bulunan mikroorganizmalar azot kaynağı olarak ilk etapta kazeini parçalar. Hücre dışı enzimlerin rol oynadığı proteoliz sonucunda çok sayıda oligopeptit ortaya çıkar. İlerleyen süreçte ortaya çıkan oligopeptitler daha ileri proteoliz reaksiyonları için hücre içine alınır. Hücre içi peptidazların rol oynadığı daha ileri parçalanmalar neticesinde kısa peptit zincirleri açığa çıkar (Christensen ve ark.,1999; Yamamoto ve ark., 1999). Yoğurdun biyoaktif peptit içeriği ile ilgili yurt dışı kaynaklı çeşitli çalışmalara rastlanmıştır (Lorenzen ve Meisel, 2005; Donkor ve ark., 2007; Papadimitriou ve ark., 2007; Plaisancie ve ark., 2013). Aloğlu ve Öner (2011)'in yoğurt kaynaklı biyoaktif peptitlerin antioksidatif aktivitesi üzerinde yaptıkları inceleme dışında ülkemizde daha çok süt proteinleri kaynaklı ACE inhibitör peptitler konusunda derlemeler olduğu görülmüştür (Kesler ve ark., 2008; Akpınar ve Uysal, 2013; Koçak ve Şanlı, 2016). Yerlikaya ve ark., (2011) ile Otağ ve Hayta (2013)'nin derlemeleri ise biyoaktif peptitler konusunda daha kapsamlı çalışmalar olarak literatürde yer almaktadır. Tarhananın diğer bir ana bileşeni olan buğdayın biyoaktif peptit kaynağı olarak incelendiği çalışmaların sayısı ise daha sınırlıdır.

Bu çalışmada farklı tekniklerle üretilmiş Maraş tarhanalarındaki proteinlerin yapısı içinde “biyoaktif peptit” olarak tanımlanan ve inaktif olan ancak mikroorganizmaların enzimatik aktivitesi (hidroliz) sonucunda veya sindirim sistemi enzimlerinin proteolitik aktiviteleri sonucunda mide-bağırsak sisteminde açığa çıkarak önemli fizyolojik aktiviteler sergileyen amino asit zincirlerinin varlığı araştırılmış, tarhana ve tarhananın ana bileşenleri olan yoğurt ve buğdayın suda çözünen fazlarının peptit profilleri karşılaştırılmış, kütle spektrometresinde tarhana, yoğurt ve dövme örneklerinin pepsin-tripsin hidrolizatlarının içerdikleri peptitler araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif bileşikler ilk defa 1950 yılında Mellander tarafından belirlenmiş ve günümüzde özellikle süt proteinleri kaynaklı opioid, antitrombotik, antihipertansif, antimikrobiyal, antikanserojen, mineral bağlayıcı ve immunomodülatör aktiviteye sahip peptitler tanımlanmıştır. Biyoaktif peptitlerin sergiledikleri fizyolojik aktivite, aminoasit kompozisyonlarına ve dizilerine bağlıdır (Gür ve ark., 2010). Özellikle zincirin C-terminal ve N-terminal uçlarında bulunan aminoasitlerin fizyolojik aktivite açısından son derece önem taşıdığı belirtilmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002). Vücutta serbest hale geçtiklerinde hormon benzeri aktivite gösterip düzenleyici olarak görev yapabilmektedirler. Bu nedenle biyoaktif peptitler gıda alanında ve farmakolojik uygulamalarda kullanılabilen sağlığı destekleyici, koruyucu etmenler olarak kabul edilmektedir (Kesler ve ark., 2008).

Biyoaktif peptitlerin üretiminde kullanılan en yaygın yolun, ham proteinlerin pepsin, tripsin gibi mide-bağırsak enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilen enzimatik hidrolizi olduğu belirtilmektedir (Yerlikaya ve ark., 2011). Öte yandan özellikle süt proteinlerinin hidrolizinin kompleks ve yürütülmesi zor bir işlem olduğu bu nedenle hidroliz sonunda mutlaka ayırma saflaştırma proseslerine ihtiyaç duyulduğu vurgulanmaktadır. Nitekim hidroliz neticesinde çok fazla sayıda farklı dizilimli ve farklı moleküler boyutlu (400-10000 Da) peptit zincirinin açığa çıktığı ifade edilmektedir. Sonuç olarak peptit zincirlerinin fizyokimyasal açıdan (büyüklük, elektrik yükü, adsorpsiyon karakteri, çözünebilirlik) büyük farklılıklar taşıdığı bu nedenle de ayırma – saflaştırma işlemlerinin yürütülmesinde güçlükler yaşandığının altı çizilmektedir.

Biyoaktif peptitlerin ticari olarak üretimi geniş ölçekte uygun teknolojilerin eksikliği nedeniyle sınırlıdır. Günümüzde belirli molekül ağırlığındaki peptitlerin zenginleştirilmesi için en uygun yol membran ayırma tekniği olarak gösterilmektedir. Bununla beraber enzimatik uygulamalarla birleştirilen kesiksiz sistem membran reaktörlerinin kullanılarak özel peptit dizilerinin üretimine 1990'lı yıllarda başlandığı ifade edilmektedir (Şanlıdere ve Öner, 2006). Öte yandan gıda endüstrisinin biyoaktif peptitlerden fonksiyonel ürünlerin yapısında faydalanabilmesi için ayrıştırma, zenginleştirme, konsantre etme tekniklerinin endüstriyel boyutta üretime imkân tanıyacak şekilde iyileştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Laboratuvar koşullarında yürütülen analitik yöntemlerle çeşitli peptitler

fraksiyonlarına ayrıştırılabilir de bu tekniklerin endüstriyel boyutta bir uygulaması henüz bulunmamaktadır. Üstelik hali hazırda kullanılan ticari saflaştırma tekniklerinin de arzu edilen peptidin eldesinde ihtiyaç duyulan ayırma verimine ulaşamadığı belirtilmektedir.

Fermente et, süt, baklagil ürünlerinin üretiminde bir ana basamak olan fermantasyon aşamasında gerçekleşen mikrobiyal hidrolizin neticesinde açığa çıkan biyoaktif peptitlerin bu ürünlerin fonksiyonel niteliklerini arttırabileceği değerlendirilmektedir (Akpınar ve Uysal, 2013). Biyoaktif peptitlerin literatürde geçen bazı fizyolojik aktiviteleri çizelge 2.1’de verilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Nongonierma ve FitzGerald, 2015).

Çizelge 2.1. Biyoaktif peptitlerin öncül proteinleri ve sergiledikleri fizyolojik aktiviteleri

Kaynak protein	Biyoaktif peptitler	Fizyolojik aktivite
$\alpha$ , $\beta$ -kazein	Kazomorfinler	Opioid agonist (bağırsak hareketliliğini azaltır, gastrik boşalma hızı düşer; amino asit ve elektrolit alımı artar)
	Kazokininler	ACE inhibitörü
	Fosfopeptitler	Mineral bağlama
	İmmunopeptitler Kazomorfinler Kazokininler	İmmunomodülatör (immün cevabı hızlandırır, fagositik aktiviteyi arttırır)
$\alpha$ -laktalbumin $\beta$ -laktoglobulin Serum albumini	Laktokininler	ACE inhibitörü
$\alpha_{s1}$ -kazein	İsrasidin	Antimikrobiyal
$\alpha_{s2}$ -kazein	Kazosidin	Antimikrobiyal
Laktoferrin	Laktoferrisin B	Antimikrobiyal
	Laktoferroksin	Opioid antagonist
$\kappa$ -kazein	Kazoplatelinler	Antitrombotik (pıhtılaşmayı yavaşlatır)
	Kazoksin	Opioid antagonist
İmmunoglobulinler	IgA, IgG	İmmunomodülatör (pasif bağışıklık, NK hücre aktivitesinde artış, humoral immün yanıt)
$\beta$ -laktoglobulin Serum albumini	Laktorfinler	Opioid agonist
Serum albumini	Serorfinler	Opioid agonist

Sah ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada yoğurttan elde ettikleri sulu fazdaki peptit ekstraktının *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkisini ve HT29 (kolon kanseri hücresi) hücresinin gelişmesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Suda çözünen peptit ekstraktlarının seçilen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği ve bu etkinin gram negatif bakteri üzerinde daha kuvvetli olduğu ifade edilmektedir. Bununla beraber peptit ekstraktlarının HT29 hücreleri üzerinde inhibitif etki gösterdiği belirtilmektedir. Peptit ekstraktlarının antimikrobiyal ve inhibitif etkisinin yoğurda prebiyotik katkıların ilave edilmesi durumunda arttığı, peptit ekstraktlarının mide-bağırsak enzimleriyle hidrolizi sonrasında söz konusu etkilerin azaldığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacıların 2014 yılında yaptıkları çalışmada probiyotik yoğurtlardan ekstrakte edilen suda çözünen peptitlerin antioksidant aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmada starter yoğurt kültürüne (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) ilave olarak probiyotik kültür içeren (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* *Lactobacillus paracasei*) yoğurt örneklerinden elde edilen suda çözünen peptit ekstraktlarının DPPH metoduyla ölçülen IC<sub>50</sub> değeri 1,51 mg ml<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Öte yandan yalnızca starter yoğurt kültürü içeren yoğurttan elde edilen peptit ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri 2,23 mg ml<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Probiyotik yoğurtlardan elde edilen ekstraktların daha kuvvetli antioksidant aktivite göstermiş olması bu yoğurtlara katılan probiyotik kültürlerin proteolitik aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir (Sah ve ark., 2014).

Jin ve ark., (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada yoğurt ve yoğurdun gastrik, pankreatik hidrolizatlarının peptit içeriğini araştırmışlar, örneklerin ACE ve DPP-IV inhibitör aktivitelerini kıyaslamışlardır. Çalışmada ACE ve DPP-IV inhibitör aktivitesi en düşük olan örneğin yoğurt, en yüksek olan örneğin yoğurdun pankreatik hidrolizatı olduğu bulunmuştur. Yoğurt ve yoğurt hidrolizatlarının kütle spektrometresi analizinde tespit edilen peptitlerden 30 tanesinin daha önce literatürde tanımlanmış olan biyoaktif peptit zincirleri olduğu ifade edilmiştir. Bu peptitler içinden opioid ve antihipertansif etki gösteren VYFPFGPIP, antihipertansif etki gösteren NIPPLTQTPV, immunomodülatör etki gösteren YQEPVLGPRVGPFPPII ve antioksidatif etki gösteren QEPVLGPVRGPFPII peptit zincirlerinin her üç örnekte (yoğurt, yoğurdun gastrik ve pankreatik hidrolizatı) de tespit edildiği belirtilmiştir.

Zhao ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada ekmek üretiminin farklı aşamalarında ACE inhibitör tripeptitlerin konsantrasyonunu araştırmışlardır. Buna göre buğday unundan elde edilen ekşi hamurun yapısındaki baskın (58 µmol kg<sup>-1</sup>) ACE inhibitör peptitin IPP tripeptiti

olduğu bildirilmiştir. IPP tripeptitinin ardından en yüksek konsantrasyona sahip LPP, LQP, LIP ve VPP tripeptitlerinin konsantrasyonlarının sırasıyla 43,7  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , 31  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , 16,8  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  ve 9,1  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  olduğu ifade edilmektedir. Tripeptit konsantrasyonlarının hamur oluşum aşamasındaki enzimatik reaksiyonlara bağlı olarak azaldığı ancak IPP, LPP ve VPP konsantrasyonunun bu aşamada stabil kaldığı belirtilmektedir. Öte yandan hamurlara uygulanan ısı işleme bağlı olarak tüm peptitlerin konsantrasyonunda azalma olduğu vurgulanmıştır.

Kunda ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada ticari olarak satılan ACE inhibitör peptit içerikli yoğurtları incelemişlerdir. Çalışmada yoğurt ekstraktları SPE kolonlarında saflaştırılarak microLC-TOF-MS cihazında analiz edilmiştir. Kütle spektrometresi verilerinden yola çıkılarak 85 adet peptit tanımlandığı, içlerinden 9 tanesinin (FP, YP, FF, IPP, VPP, VLPVPQ, TTMLPW, VLPVPQK ve VYFPFGPIP) antihipertansif etkisinin daha önceki çalışmalarda deneysel olarak gösterildiği ifade edilmiştir. Yoğurt ekstraktlarında tespit edilen peptitlerden VPP ve IPP tripeptitlerinin yoğurt üreticisi tarafından temel antihipertansif içerik olarak belirtildiği vurgulanmıştır.

Kancabaş ve Karakaya (2012) yaptıkları çalışmada fermente bir tahıl ürünü olan bozanın ACE inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmada bozanın ve bozadan izoelektrik çöktürme yöntemiyle ayrıştırılan proteinlerin pepsin hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesi ölçülmüştür. Bozadan elde edilen proteinlerin hidrolizatları moleküler ağırlıklarına göre üç fraksiyona ayrılmıştır (Moleküler ağırlık < 5 kDa, 5 kDa < Moleküler ağırlık < 10 kDa, 10 kDa < Moleküler ağırlık < 20 kDa). Çalışma sonuçlarında bozanın ACE inhibisyonu  $IC_{50}$  değeri 7,2  $\mu\text{g protein ml}^{-1}$  olarak belirtilmiştir.  $IC_{50}$  değeri boza protein hidrolizatı için ise 2,63  $\mu\text{g protein ml}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber molekül ağırlığı 10-20 kDa arasındaki fraksiyonun  $IC_{50}$  değerinin 2,42  $\mu\text{g protein ml}^{-1}$ , 5-10 kDa arasındaki fraksiyonun 0,27  $\mu\text{g protein ml}^{-1}$  ve 5 kDa'dan küçük fraksiyonun 0,25  $\mu\text{g protein ml}^{-1}$  olduğu bildirilmiştir.

Nogata ve ark., (2009)'nın çalışmasında buğdayın öğütülmesiyle elde edilen ürünler 40 °C'de 12 saat boyunca otolize uğratılmıştır. Otolizatlar SPE kolonlarında fraksiyonlarına ayrılmış, elde edilen fraksiyonların ACE inhibitör aktiviteleri ölçülmüştür. Buna göre en yüksek ACE inhibitör aktivite buğday kepeği otolizatlarının fraksiyonlarında gözlenmiştir ( $IC_{50}$ : 0,08 mg protein  $\text{ml}^{-1}$ ).

Rizzello ve ark., (2008) buğday unu, tam buğday unu ve çavdar unuyla hazırlanan ekşi maya hamurdaki ACE inhibitör peptitleri incelemiştir. Sıvı kromatografisinde fraksiyonlarına ayrıştırılan farklı hamur örneklerinden en yüksek ACE inhibisyon yüzdesine sahip fraksiyon (tam buğday unu ekşi hamuru, % 96 ACE inhibisyon oranı) kütle spektrometresinde incelenmiştir. Kütle spektrometresi verilerine göre DPVAPLQSRGPEI, PVAPQLSRGLL, ELEIVMASPP ve QILLPRPGQAA peptitlerini içeren fraksiyonun ACE inhibisyonu için  $IC_{50}$  değeri  $0,19 \text{ mg ml}^{-1}$ , PVAPLQSRGPE, PRSGNVGESGL, VAPSRPTPR, DIIIPD ve PRSGNVGESGLID peptitlerini içeren fraksiyonun  $IC_{50}$  değeri  $0,54 \text{ mg ml}^{-1}$ , DPVAPLQSRGPEI, DPVAPLQSRGPEIP, PVAPLPRKGS, DPVAPLQSRGPE ve SFTAGARTFNFDENPCDYFQGGKIKAT peptitlerini içeren fraksiyonun  $IC_{50}$  değeri  $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$  olarak bildirilmiştir.

Nakamura ve ark., (2007) tam buğday unuyla hazırlanan ekşi maya hamurda bulunan düşük molekül ağırlıklı peptitleri araştırmışlardır. Liyofilize edilen ve öğütülen ekşi maya hamurdan ekstrakte edilen peptitler santrifüj filtrede fraksiyonlarına ayrılmış, moleküler ağırlığı 10 kDa'un altında kalan peptitler analizlerde kullanılmıştır. Bu peptitlerin HPLC kromatogramından seçilen pikler, LC-MS/MS cihazında tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda tespit edilen VPFQVG peptitinin ACE inhibisyonu  $IC_{50}$  değeri  $336 \mu \text{ mol l}^{-1}$  olarak verilmiştir. Söz konusu peptitin ekşi hamurda  $5,8 \mu \text{g g}^{-1}$  (kuru maddede) düzeyinde bulunduğu bildirilmiştir.

Jeong ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada H3 ve H4 histonlarının asetillenmesi üzerinde inhibitif etki gösteren 43 amino asitten oluşan "lunasin" peptitinin buğdaydaki varlığını araştırmışlar ve lunasinin doza bağlı inhibitif etkisini incelemiştir. Bu amaçla lunasin katkılı buğdayla beslenen ratların karaciğerindeki lunasin miktarı ve buğdayın yapısında bulunan lunasin miktarı LC-ESI-MS cihazında belirlenmiştir. Lunasinin dozu arttıkça asetillenen histon H3 ve H4 konsantrasyonunun azaldığı, iki değişken arasındaki korelasyonun oldukça yüksek (histon H3: 0,98, histon H4: 0,96) olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber ratların karaciğerinden izole edilen lunasin miktarının, rat yemlerine katılan lunasin miktarının artışına bağlı olarak arttığı sonucuna yer verilmiştir.

## 2.2. Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonları

### 2.2.1. Antioksidatif Etki

Süt, yumurta sarısı, buğday proteinleri ve bunlardan elde edilen çeşitli gıdalardaki proteinlerin hidrolizatlarının antioksidan etki gösterdikleri bildirilmektedir (Peng ve ark., 2009; Delgado ve ark., 2011). Bununla beraber baklagiller, bezelye ve serumdaki albüminlerin de antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmektedir. Öte yandan antioksidan aktivite açısından süt proteinleri daha sık çalışılmıştır. Süt proteinlerinden laktoferrin,  $\beta$ -laktoglobulin ve kazein başta olmak üzere yumurta sarısı proteini olan fosvitin, mısırdaki zein ve yer elmasında dioskorin gibi proteinlerin antioksidan aktivite taşıdıkları belirtilmektedir (Arcan ve Yemenicioğlu, 2007). Proteinlerin ve hidrolizatlarının antioksidan aktivitelerinin peptit zincirinde yer alan histidin, triptofan, arginin, lösin, lizin, sistein,  $\beta$ -hidroksi triptofan ve valin gibi aminoasitlerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Xie ve ark., 2008). Aminoasitlerin serbest radikallere proton vererek veya metal iyonları ile şelat oluşturarak antioksidant aktivite sergiledikleri düşünülmektedir. Triptofan ve fenilalanin gibi aromatik halkalı aminoasitler ve sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitler serbest radikallere proton vererek aktivite gösterirken glutamat, aspartat, arginin gibi temel aminoasitlerin de metal iyonları ile şelat oluşturarak antioksidant aktivite gösterdikleri düşünülmektedir. Bununla beraber histidin aminoasitindeki imidazol halkasının yukarıda belirtilen her iki yolla da etki gösterdiği belirtilmektedir. Antioksidant aktivite gösteren peptitlerin doğal katkı maddeleri olarak kullanılabilmesi değerlendirilmektedir. Enzim yapısındaki diğer antioksidatif bileşenlerle kıyaslandığında antioksidant aktivite gösteren peptitlerin daha stabil olduğu belirtilmektedir (Xie ve ark., 2008). Bununla beraber kullanılacağı gıdaya göre kıvam (jelleşme), renk (maillard reaksiyonları) ve tat (peptitlerden kaynaklanan acılık) problemlerine de yol açabileceği de düşünülmektedir (Elias ve ark., 2008). Bu nedenle antioksidant aktivite gösteren peptitlerin gıdalarda kullanımının avantaj ve dezavantajları katkılanacağı gıdaya göre değerlendirilmelidir.

Pepe ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada İtalyan “Stracchino” peynirinden RP-HPLC yöntemiyle izole edilen fraksiyonların antioksidant aktivitesini araştırmışlardır. Peynirden elde edilen fraksiyonlar UHPLC/MS-MS’de görüntülenmiştir. Reaktif oksijen türlerini azalttığı saptanan fraksiyonlarda baskın şekilde bulunan EAMAPK peptit zinciri kimyasal olarak sentezlenmiş ve peptit zincirinin antioksidant aktivitesi ABTS metoduna

göre ölçülmüştür. Sonuçların 19,5-22,9 µmol Trolox eşdeğeri mg<sup>-1</sup> aralığında olduğu belirtilmiştir.

Lollo ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada peynir altı suyu (PAS) protein hidrolizatlarının Brezilyalı bir grup futbolcu üzerindeki etkisi incelenmiştir. 24 futbolcu 3 farklı beslenme grubuna (PAS protein, PAS protein hidrolizat, placebo protein) ayrılarak 12 hafta boyunca gözlemlenmiştir. 12 hafta sonunda PAS protein hidrolizatı ile desteklenen gruptaki kişilerin oksidatif stres indikatörleri düzeylerinde placebo protein grubuna göre oldukça büyük düşüş gözlenmiştir (kreatin kinaz -% 42, laktat dehidrogenaz -% 30). PAS proteinle desteklenen grubun değerleri placebo grup ile farklılık göstermemiştir.

Sah ve ark., (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı probiyotik türlerin (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC BAA52) yoğurdun peptit profili üzerindeki etkilerini inceleyerek söz konusu peptitlerin antioksidant ve antimutajenik etkilerini kıyaslamışlardır. Sadece yoğurt kültürü ile üretilen yoğurtlardaki proteinlerin OPA (o-phtalaldehide) metoduna göre hesaplanan hidroliz derecesi % 5,38, ilave olarak her üç probiyotik mikroorganizmanın da aşılandığı yoğurtlardaki ise % 11,91 olarak bulunmuştur. Sadece yoğurt kültürü ile üretilen yoğurtların IC<sub>50</sub> değeri 2,23 mg ml<sup>-1</sup> iken her üç probiyotik mikroorganizmanın da aşılandığı yoğurtların IC<sub>50</sub> değeri 1,51 mg ml<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır (Troloxun IC<sub>50</sub> değeri: 0,23 mg ml<sup>-1</sup>). Sonuç olarak proteinlerin daha ileri hidrolizi ile ortaya çıkan peptitlerin sergilediği antioksidant aktivite ortaya konmuştur.

Conway ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada peynir altı suyu ve bunların hidrolizatlarının antioksidant aktivitelerini araştırmışlardır. Hidrolizatlar 30 kilo daltonluk ultrafiltreden geçirilmiş ve izoelektrik fraksiyonlama yapılmıştır. Fraksiyonların yapısında bulunan peptitler LC-MS cihazında tanımlanmıştır. Tanımlanan peptitlerin antioksidatif etkilerinin değerlendirilmesi için bir puan tablosu hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Puan tablosuna göre LC-MS analizinde tanımlanan peptitlerin antioksidatif etki puanları; üst sınır: 16,5, alt sınır:5,5 ve ortalama: 8,7 olarak bildirilmiştir.



Çizelge 2.2. Peptit zincirinde bulunan amino asitlere göre oluşturulan puan tablosu

Peptit sekansı	Puan
Sekansta bulunan W	5
Sekansta bulunan Y	2
Kısa peptit sekansı (2-10 amino asit)	2
Sekansta bulunan H, K, P, F, V veya I	1
N-terminalinde Y, W, V veya L	0,5
C-terminalinde W, Y veya M	0,5

Aloğlu ve ark., (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada geleneksel ve ticari yoğurtların suda çözünen ekstraktlarının antioksidant aktivitesi incelenmiştir. RP-HPLC kolonda 214 nm dalga boyunda pik veren alanlar seçilerek potansiyel antioksidant peptit olarak tanımlanmıştır. Kolondan çıkış zamanlarına göre seçilen fraksiyonların ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbezotiazolin-6-sulfonat) metoduna göre gerçekleştirilen analizleri neticesinde ticari yoğurtların antioksidant aktivitesi ortalama 7,697 – 8,739 mM trolox g<sup>-1</sup>, geleneksel yoğurtların ise 10,115 – 13,182 mM trolox g<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür.

Songisepp ve ark., (2004) peynir üretiminde kullanılan starter kültürlerine ilave olarak probiyotik *Lactobacillus fermentum* suşunu kullanmışlar ve peynirlerin antioksidant aktivitesindeki farklılığı gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada depolama süresince antioksidant aktivitenin arttığını belirtmişlerdir. Peynirlerin depolanması sırasında kazeinin proteolizi ile çok sayıda peptit açığa çıkmıştır. Probiyotik bakteriler kullanılarak üretilen peynirlerde proteolitik aktivitenin artması nedeniyle açığa çıkan peptit miktarı daha fazla olmuştur.

### 2.2.2. Antihipertansif Etki

Kan basıncını düşürücü peptitler başlıca süt proteinleri türevli kazokininler ve laktokininler olarak tanımlanmaktadır (Kesler ve ark., 2008). Bu peptitler kan basıncının ayarlanmasında önemli etkisi olan angiotension-I converting enzyme (ACE) için inhibitör görevi görürler. ACE vücutta hipertansif (kan basıncını yükselten) aktivite gösteren farklı dokularda bulunan ve çok fonksiyonlu, hücre dışı bir enzimdir. ACE'nin kan basıncının düzenlenmesi yanında vücuttaki su dengesinin ayarlanmasında da önemli etkilere sahip olduğu ifade edilmektedir. Antihipertansif peptitlerin ACE üzerindeki inhibitif etkisi neticesinde kan basıncını düşürdükleri belirtilmektedir. Günümüzde yüksek kan basıncı

(hipertansiyon) başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıkların etkenlerinden birisi olarak değerlendirilmektedir (Kesler ve ark., 2008; Yerlikaya ve ark., 2011). Bu nedenle özellikle batı ülkeleri ve Japon toplumunda oldukça yaygın görülen hipertansiyona karşı ACE inhibitörü peptitlerin önemli olduğu belirtilmektedir. Nitekim hipertansiyonun önlenmesinde yaşam tarzının değiştirilmesi veya ilaç tedavisi kadar beslenme alışkanlıklarının da gözden geçirilmesinin önemli olduğu değerlendirilmektedir. İçeriğinde ACE inhibitörü peptitlerin bulunduğu gıdaları tüketen bireylerin kan basıncında önemli oranda düşüş gözlemlendiği belirtilmektedir (Ryhanen ve ark., 2001; Akpınar, 2013). Bu nedenle ACE inhibitörü aktiviteye sahip yeni, fonksiyonel gıdaların üretimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Çizelge 2.3’ de ACE inhibitör peptit/peptitler içeren ticari ürünler listelenmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2006; Hartmann ve Meisel, 2007).

Çizelge 2.3. ACE inhibitör peptit içeren bazı ticari ürünler

Ürün adı	Ürün tipi	Peptit içeriği	Üretici
Calpis AMEEL S	Fermente süt	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Calpis Co., Japonya
Evolus	Kalsiyumla zenginleştirilmiş fermente süt	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	Valio Oy, Finlandiya
C12 Peption	Gıda katkısı	Kazein kaynaklı FFVAPFPEVFGK	DMV, Hollanda
Peptide Soup	Çorba	Bonito kaynaklı peptitler	Nippon, Japonya
Casein DP Peptio Drink	Meşrubat	Kazein kaynaklı FFVAPFPEVFGK	Kanebo, Japonya
Biozate	Hidrolize edilmiş peynir altı suyu proteinleri izolatu	$\beta$ -laktoglobulin fragmentleri	Davisco, Amerika Birleşik Devletleri

Yüksek tansiyon önleyici peptitlerin kimyasal yapıları, vücuttaki aktiviteleri ve etki mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi bulunmaktadır. Antihipertansif (yüksek tansiyonu önleyici) peptitler ACE’ yi inhibe ederek tansiyon düşürücü etki gösterirler. ACE inhibitör aktivite için C-terminal uçta aromatik amino asitlerin varlığı önemli görülmektedir. İzolösin-Triptofan (IW) dipeptiti literatürde tanımlanmış en güçlü ACE inhibitör dipeptitlerden

birisidir. IW dipeptitinin ACE inhibitör aktivitesinin 0,7  $\mu\text{mol l}^{-1}$  olduğu belirtilmiştir (Martin ve ark., 2008). Literatürde sıkça geçen süt proteinleri kaynaklı izolösin-prolin-prolin (IPP) ve valin-prolin-prolin (VPP) tripeptitlerinin ise ACE inhibitör aktiviteleri sırasıyla 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ve 9  $\mu\text{mol l}^{-1}$  olarak belirtilmiştir (Jakala ve Vapaatalo, 2010).

Fekete ve ark., (2015) ACE inhibitörlerin yetişkin bireyler üzerindeki tansiyon düşürücü etkisine dair seçtikleri 33 veri seti üzerindeki yaptıkları değerlendirme sonucunda sistolik kan basıncında ortalama 2,95 mmHg, diastolik kan basıncında ortalama 1,51 mmHg azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Bu değerlendirmede de Japon deneklerin kan basıncında görülen düşüşün Avrupalı deneklerden ciddi oranda fazla olduğu ifade edilmiştir.

Turpeinen ve ark., (2013) izolösin-prolin-prolin ve valin-prolin-prolin ACE inhibitörü tripeptitlerin değerlendirildiği, 1996-2010 yılları arasında yapılmış 19 farklı placebo kontrollü klinik deneyi incelemişlerdir. Deneylerde pre-hipertansiyon ve orta şiddetli hipertansiyon hastası 1500 yetişkin yer almıştır. ACE inhibitörü peptitlere bağlı ortalama sistolik kan basıncındaki azalma 4 mmHg, diastolik kan basıncındaki azalma 1,9 mmHg olarak belirlenmiştir.

Cicero ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada, ACE inhibitör peptitlerle (valin-prolin-prolin ve izolösin-prolin-prolin) gerçekleştirilen ve sonuçları net bir şekilde ifade edilmiş 18 klinik deneyi incelemişlerdir. Yapılan değerlendirme sonucunda deneklerin sistolik kan basıncında ortalama 3,73 mmHg, diastolik kan basıncında 1,97 mmHg azalma gerçekleştiği görülmüştür. Bununla beraber kan basıncındaki azalmanın Asya kökenli deneklerde daha belirgin olduğu ifade edilmiştir.

Xu ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada 1996 ve 2005 yılları arasında ACE inhibitörü peptitlere dair gerçekleştirilen, 623 yetişkinin dahil olduğu dokuz farklı çalışmanın sonuçları analiz edilmiştir. Analizi gerçekleştirilen çalışmalarda izolösin-prolin-prolin ve valin-prolin-prolin aminoasit zincirine sahip iki tripeptit kullanılmıştır. Buna göre ACE inhibitörü tripeptitlerin sistolik kan basıncını 4,8 mmHg, diastolik kan basıncını 2,2 mmHg değerinde düşürdüğü tespit edilmiştir. Aynı zamanda kan basıncındaki azalmanın hipertansiyon hastası kişilerde daha belirgin gözlemlendiği belirtilmiştir.

Chobert ve ark., (2005)  $\beta$ -laktoglobulini tripsin enzimi ile hidrolize uğratarak ortaya çıkan fazı RP-HPLC'de incelemişlerdir. Bu çalışmada HPLC kromatogramından seçilen piklerin ACE inhibitör aktivitelerine bakarak sonrasında piklerin kütle spektrometresinde tanımlanması yapılmıştır. Buna göre ALK, IIAEK, IIAEKT, IDALNENK peptitlerini

içeren fraksiyon % 67,6, GLDIQK, IDALNENK, TPEVDNEALEK peptitlerini içeren fraksiyon % 71,2 ve tek başına IIVTQTMK peptitini içeren fraksiyon ise % 70,8 ACE inhibisyon aktivitesi göstermiştir.

Motoi ve Kodama'nın (2003) çalışmasında buğday gliadin hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. Hidroliz için farklı enzimler seçilmiş ve her bir hidrolizatın ACE inhibitör aktivitesi hesaplanmıştır. ACE inhibitör aktivitesi en yüksek gliadin hidrolizatı çeşitli kromatografik metotlarla ayırma tabi tutulmuştur. Ayırma ve saflaştırma işlemleri sonunda Ile-Ala-Pro (IC<sub>50</sub>: 2,7 µM) peptit dizisi gliadin kaynaklı ACE inhibitör peptit olarak tanımlanmıştır.

### 2.2.3. Antimikrobiyal Etki

Sütün çeşitli enfeksiyonların önlenmesinde koruyucu etki gösterdiği uzun yıllar önce farkına varılan bir konudur. Sütün, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin ortaya çıkmasında katkısı olan muhtemel bileşenlerden birisi de süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan antimikrobiyal peptitler (AMP)'dir. Başlıcaları laktoferrin türevli laktoferrisin, α<sub>s1</sub>-kazein türevli israsidin, α<sub>s2</sub>-kazein türevli kazosidindir. Laktoferrisinin, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde; israsidinin, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* üzerinde; kazosidinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus carnosus* üzerinde in-vitro koşullarda inhibitif etki gösterdiği belirtilmektedir (Yüksel ve Arslan, 2016).

Hayes ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada sodyum kazeinatın *Lb. Acidophilus* DPC6026 ile fermantasyonu sonucunda açığa çıkan üç peptitin (Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu, Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg, Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys) patojenik *Enterobacter sakazakii* ATCC12868 ve *Escherichia coli* DPC5063 suşlarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Liepke ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada anne sütü kaynaklı κ-kazeine ait 63-117 aminoasit fragmentinin *Escherichia coli* BL21 üzerinde inhibitif etki gösterdiğini bulmuşlardır. κ-kazeinin 63-117 fragmenti, anne sütünün HCl ile asidifikasyonu (pH: 3,5) sonrasında pepsin ile 37 °C'de 2 saatlik hidrolizi ile ortaya çıkan hidrolizatların HPLC'de saflaştırılmasıyla elde edilmiştir.

Malkoski ve ark., (2001) yaptıkları çalışmada κ-kazeinin 138-158 fragmentinin *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* ve *Porphyromonas gingivalis* üzerinde

antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir.  $\kappa$ -kazeinin fosforlanmış ve glikozlanmamış 138-158 bölgesini kappasin olarak isimlendirmişlerdir. Söz konusu peptitin *Streptococcus mutans* üzerindeki MIC değeri  $59 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $26\mu\text{M}$ ) olarak belirtilmiştir.

Recio ve Visser (1999)  $\alpha_{s2}$ -kazein türevli iki farklı antimikrobiyal peptit tanımlamışlardır.  $\alpha_{s2}$ -kazeinin pepsin ile hidrolizi sonucu serbest kalan 183-207 ve 164-179 bölgelerinin gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde kayda değer şekilde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Araştırmada  $\alpha_{s2}$ -kazeinin 183-207 fragmentinin *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Bacillus cereus* P7 üzerindeki MIC değeri  $16 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur.

Zucht ve ark., (1995)  $\alpha_{s2}$ -kazeinin hidrolizatından izole ettikleri 39 amino asitten oluşan peptidin (f 165-203), *Escherichia coli* ve *Staphylococcus carnosus*'un gelişimini inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır.

#### **2.2.4. Mineral Bağlayıcı Etki**

Mineral metabolizmasını etkileyen biyoaktif bileşenlerin sütteki varlığı ilk olarak 1950 yılında Mellander tarafından çalışılmıştır. Mellander kazeinofosfopeptitlerin raşitik bebeklerde D vitamininden ayrı olarak kemikte kalsiyum Emilimini arttırdığını ileri sürmüştür. Bu bağlamda kazeinofosfopeptitlerle (KFP) zenginleştirilmiş pirinç bazlı bebek mamalarının kalsiyum ve çinko Emilimini arttırdığı ifade edilmektedir (Yerlikaya ve ark., 2011). Bir fosforil köküne sahip KFP'ler negatif yükleri sayesinde ileri proteolize karşı dirençlidir. Çözünür organofosfat tuzları da barındırabilen KFP'ler ince bağırsağın uç kısmında kalsiyum çökmesini sınırlandırarak kalsiyum Emiliminin artmasına yol açabilmektedir. KFP'lerin negatif yüklü bölgeleri mineraller için bağlanma bölgesi görevi görürken bu bölgelere Ca, Mg, Fe ve Zn mineralleri bağlanabilmektedir. Bu sebeple KFP'ler diş hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Bouhallab ve Bougle (2004)  $\beta$ -kazeinin 1-25 fragmenti ( $\beta$  1-25) ile yaptıkları çalışmada demir- $\beta$ (1-25) kompleksinin ratlarda demir Emilimi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Ratların diyetine demir- $\beta$ (1-25) yanında  $\text{FeSO}_4$  ve demir- $\beta$ -kazein kompleksi ilave edilmiştir. Deney sonunda demir- $\beta$ (1-25) diyeti alan ratların karaciğerleri ve dalaklarındaki demir konsantrasyonu diğer iki diyet grubuna (demir- $\beta$ -kazein,  $\text{FeSO}_4$ ) kıyasla 1,5 - 3 kat düzeyinde yüksek ölçülmüştür. Demir iyonlarının fosfopeptitlere olan ilgisi, aminoasit zincirinin sekansı ile ilişkilendirilmiş, aminoasit sekansının peptidin fizyolojik aktivitesini belirlediği ifade edilmiştir.  $\beta$ (1-25) zincir bölgesinde yüksek afinite ile

demir bağlayabilen 4 adet serin amino asitine bağlı fosfor bulunmaktadır (fosfoserin grupları).

### **2.2.5. Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etki**

Beslenme alışkanlığının bağışıklık sistemi üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre peptitlerin antimikrobiyal aktivite göstererek ve bağışıklık sistemi elemanlarını uyararak immun sistem üzerinde etki gösterdiği ifade edilmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002; Yerlikaya ve ark., 2011). Bağışıklık sistemini uyarıcı (immunomodülatör) peptitlerin özellikle yeni doğan yavrunun enterik bakteriler başta olmak üzere çok sayıda bakteriye karşı vücudun savunmasında görevli T hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını teşvik ettiği belirtilmektedir. Bununla beraber immunomodülatör peptitlerin insan lenfositlerinin çoğalması, makrofajların patojenik aktivitesi ve antikor sentezi üzerinde teşvik edici etkilerinin olduğu ifade edilmektedir. İmmunomodülatör peptitlerin alerjiye yatkın kişilerde alerjik reaksiyonları hafifletebildiği ve mide-bağırsak sisteminde mukozal bağışıklığın geliştirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Yerlikaya ve ark., 2011). Tüm bunlara ek olarak sütün fermantasyonu esnasında açığa çıkan peptitlerin antitümör etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Sah ve ark., 2015).

Mercier ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada ticari olarak satılan peynir altı suyu proteinlerinin ve bunların tripsin, kimotripsin ile elde edilen hidrolizatlarının bağışıklık sistemi elemanlarından limfositlerin çoğalmaları üzerindeki etkisini incelemiştir. Çalışmada fare dalağından izole edilen limfositler ve mikrofiltreden geçirilen peynir altı suyu protein izolatları (MF-WPI) kullanılmıştır. MF-WPI 100 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda limfositlerin çoğalmasını önemli ölçüde hızlandırmıştır. Öte yandan enzimatik yoldan hidrolize uğratılan MF-WPI'lar 0,5 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda dahi limfositlerin çoğalmasını teşvik etmiştir. Bu sonuçtan yola çıkılarak MF-WPI 'nın hidrolizi ile serbest kalan bazı peptitlerin bağışıklık sistemi üzerinde etkili olduğu ifade edilmiştir.

### **2.2.6. Opioid Etki**

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile süt proteinleri kaynaklı peptitlerin sinir sistemi üzerinde birtakım etkileri olduğu gösterilmiştir (Kınık ve Gürsoy, 2002; Şanlıdere ve Öner, 2006). Etkileri itibariyle morfinler ile benzerlik gösteren bu peptitler opioid peptitler olarak tanımlanmaktadır. Süt proteinleri kaynaklı opioid peptitlerin kadınlarda ve yeni doğan bebeklerde önemli fizyolojik etkileri olduğu belirtilmektedir. Opioid peptitlerin

bağırsaklarda emilim süresini düzenleyebildiği ifade edilmektedir. Bu etkileri çizgisiz kasları etkileyerek mide-bağırsak kanalından geçiş süresini kısaltmaları yoluyla veya elektrolitlerin intestinal taşınımını etkilemeleri neticesinde açığa çıkabilmektedir. Bununla beraber kazein kaynaklı opioid peptitlerden kazokinlerin uyarıcı etki gösterdiği ifade edilirken  $\alpha$  ve  $\beta$ -kazomorfinler ile ekzorfinlerin rahatlatıcı, yatıştırıcı etki gösterdikleri belirtilmektedir (Şanlıdere ve Öner, 2006). Öte yandan opioid kazein bölgeleri yetişkinlerin kan dolaşımında belirlenememiştir. Bu nedenle kazomorfinlerin sadece yeni doğan bebeklerin bağırsaklarından emildiği ve kana karıştığı bu yüzden de yeni doğanların sakin ve uyku ihtiyaçlarının yüksek olduğu ileri sürülmektedir (Yerlikaya ve ark., 2011).

Fukudome ve Yoshikawa (1992)'nin çalışmasında buğday gluteni kaynaklı dört adet opioid kısa peptit zinciri (Gly-Try-Try-Pro-Thr. Gly-Tyr-Tyr-Pro, Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu ve Tyr-Gly-Gly-Trp) tanımlanmıştır.

### **2.2.7. Antitrombotik Etki**

$\kappa$ -kazeinin kimozi ile hidrolizi sonucunda ortaya çıkan peptitlerin (kazoplatelinler) sütün pıhtılaşmasına yol açtığı ifade edilmektedir. Kazoplatelinlerin sergilediği söz konusu aktivite ile trombinin fibrinojeni parçalayarak kanı pıhtılaştırması arasında benzerlik olduğu belirtilmektedir (Şanlıdere ve Öner, 2006). Bu benzerlik  $\kappa$ -kazein ve fibrinojen arasındaki yapısal benzerlikten ileri gelmektedir.  $\kappa$ -kazeinin tripsin ile hidrolizi sonucunda ortaya çıkan amino asit zinciri (f106-110) kazopiastrin olarak isimlendirilmekte ve trombositlerin fibrinojene bağlanmasını önleyerek kanın pıhtılaşmasını engellemektedir.  $\kappa$ -kazeinin 103-111 arasındaki amino asit bölgesinin ise trombositlerin bir araya gelmesini engellerken, fibrinojenlerin trombositlerdeki reseptörlere bağlanmalarını etkilemediği belirtilmektedir (Yerlikaya ve ark., 2011). Yetişkinler üzerinde yapılan bir çalışmada 500 ml süt ve yoğurt tüketiminden sonra kanda, midede ve onikiparmak bağırsağında antitrombotik aktivite gösteren kazeinoglikopeptitler tespit edildiği bildirilmektedir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

### **2.3. Gıda Kaynaklı Biyoaktif Peptitlerin In Silico Analizleri**

Çeşitli gıdalardaki öncül proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitler “Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonları” başlığında değinilen çok çeşitli aktivitelerinden ötürü gıda ve sağlık sektörlerinde ilgi uyandırmaktadır. Öte yandan biyoaktif peptitlerin üretiminde kullanılan klasik proses (hidroliz-ayırma-saflaştırma) zahmetli, zaman alan ve yüksek maliyetli bir yaklaşımdır. Biyoaktif peptitlerin endüstriyel ölçekte üretimini oldukça

sınırlayan bu faktörlerin üstesinden gelmek için giderek artan oranda biyoinformatik araçlardan yararlanılmaktadır (Minkiewicz ve ark., 2008). Belirli fonksiyonlara sahip hedef peptitlerin hangi öncül proteinlerin hangi enzim veya enzimlerin hidrolizi ile açığa çıkacağını öngören bilgisayar simülasyonları, biyoaktif peptitlerin eldesinde daha stratejik bir yaklaşım sunmaktadır. Bu yaklaşım protein sekanslarında şifrelenmiş biyoaktif peptit zincirlerini serbest hale getirme ihtimali yüksek proteazların bulunması ve açığa çıkan peptit zincirlerinin muhtemel fizikokimyasal, biyoaktif ve duyuşsal özelliklerinin değerlendirilmesi için kullanılır (Agyei ve ark., 2018). Böylece laboratuvar analizlerinde harcanan zamandan ve malzemeden tasarruf edilebilir, laboratuvar çalışmaları in silico analizlerden elde edilen peptitler üzerinde odaklanabilir.

Szerszunowicz ve Nalecz (2018)'in çalışmasında yulaf globülinin pepsin, tripsin ve kimotripsin A ile sindirimi BIOPEP programı kullanılarak modellenmiştir. Bu çalışmaya göre yulaf globülinin seçilen enzimlerle in silico sindirimi neticesinde baskın olarak ortaya çıkan dipeptitler; DPP IV inhibitör aktivitesi gösteren mono-fonksiyonel peptitler (AL, DR, NL, PF, QF, TL ve HR), DPP IV ve ACE inhibitör aktivitesini birlikte gösteren bi-fonksiyonel peptitler (VY, SY, GF, NF, TF, SF ve GY) ile ACE inhibitör aktivite ve glukoz emiliminde uyarıcı etki gösteren bi-fonksiyonel peptitler (VL, IL) olarak belirlenmiştir.

Lafarge ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada güncel peptit veri setleri ve in silico analiz araçlarını (BLAST, ExPASy PeptideCutter, BIOPEP, PeptideRanker) kullanarak sığır ve domuz eti kaynaklı hemoglobin, kolojen ve serum albümini proteinlerinin pepsin (EC 3.4.26.1), papain (EC 3.4.22.2), bromelain (EC 3.4.22.4), ficain (EC 3.4.22.3) ve thermolysin (EC 3.4.24.27) ile hidrolizini simüle etmişlerdir. Hidroliz ile serbest kalması öngörülen peptit zincirleri içinden PeptideRanker skorları yüksek olan ve literatürde ACE – I, renin ve DPP-IV inhibitör aktivitesi rapor edilen on tanesi seçilerek kimyasal olarak sentezlenmiştir. Böylece et proteinleri hidrolizatlarının biyoaktif peptitler için kaynak teşkil edebileceği ve in-silico analiz metotlarının biyoaktif peptit eldesi ve tanımlanmasında işe yarar araçlar olduğu gösterilmiştir.

#### **2.4. Peaks Studio ve BIOPEP Programları**

Protein ve peptit dizilerinin saptanması amacıyla birçok yazılım geliştirilmiştir. Bu yazılımlar kütle spektrometresi verilerini de novo veya veri seti taraması yoluyla işleyerek protein, peptit sekanslarını saptamaktadır. Peaks Studio programı kütle spektrometresinden



elde edilen spektrumların değerlendirildiği bir yazılımdır. De novo özelliği kullanarak yapılan peptit sekanslama işleminde programın doğrudan MS/MS spektrumlarını kullandığı, veri seti taramasında ise programın veri setinde MS/MS spektrumlarıyla en iyi eşleşen sekanslamayı aradığı ifade edilmektedir. Peaks Studio programının Mascot, SEQUEST, X!Tandem ve OMSSA gibi diğer veri seti tarama programlarına kıyasla de novo sekanslama sonuçlarından daha fazla faydalandığı, bu şekilde diğer veri seti tarama programlarına kıyasla daha hassas ve doğruluğu yüksek sonuçlar elde edildiği vurgulanmaktadır (Zhang ve ark., 2012).

BIOPEP programı internet tarayıcısı tabanlı protein ve peptit zincirlerinin depolandığı, çeşitli fonksiyonlara sahip bir veri setidir. Veri setinde 740 protein ve 3697 adet biyoaktif peptit zinciri tanımlıdır (Anonim, 2018a). Belirli bir amino asit sekansının veri setinde fizyolojik aktivitesinin taranabilmesi ve belirli bir amino asit sekansı veya protein dizisinin içinde kodlanmış biyoaktif peptitleri listeleyebilmesi programın önemli bir özelliğidir. Bununla beraber veri setinde yer alan bir protein seçilerek veya programa belirli bir amino asit sekansı tanıtılarak bu dizinin farklı enzimlerle hidrolizinin simülasyonunu gerçekleştirebilmesi ve ortaya çıkan peptitlerin varsa biyoaktivitelerini listelemesi programın in silico sindirim modellerinde kullanılmasına imkân tanımaktadır (Minkiewicz ve ark., 2008).

Literatürde BIOPEP ve benzeri bioinformatik araçların kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (Lafarge ve ark., 2014; Dziuba ve Dziuba, 2014; Iwaniak ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017). Cavazos ve de Mejia (2013)'nın BIOPEP programını kullanarak buğday, arpa, yulaf ve pirinç proteinlerinin hidrolizi neticesinde ortaya çıkması muhtemel peptit zincirlerini araştırdıkları çalışmaları BIOPEP programının kullanımına dair kapsamlı bir örnektir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Tam yağlı UHT süt (Sek) yerel bir marketten satın alınmıştır. Yoğurt kültürü (CH-1 Thermophilic DVS) Chr Hansen (İstanbul) firmasından temin edilmiştir. Dövme yerel bir değirmenden temin edilmiştir. Tripsin enzimi Sigma (~10,000 BAEE units mg<sup>-1</sup> protein, ürün no: t8003) ve pepsin enzimi Fisher Chemical (ürün no: P-1120-48) firmalarından temin edilmiştir. Kütle spektrometresi verileri PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions Inc. Waterloo, Canada, versiyon:8.5) programında değerlendirilmiştir. Peptitlerin fizyolojik aktiviteleri BIOPEP-UWM (Anonim, 2018a) programında araştırılmıştır. Peptit zincirlerinin kaynak proteinlerinin bulunması için ScanProsite (Anonim, 2018b) programından yararlanılmıştır. ScanProsite ve PEAKS Studio programlarıyla yapılan çalışmalarda UniProt KB (Anonim, 2018c) veri seti kullanılmıştır. Bazı peptitlerin antioksidatif potansiyellerinin değerlendirilmesi için Conway ve ark., (2013)'ün hazırladığı antioksidatif etki puan tablosu kullanılmıştır.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Yoğurt yapımı

Yoğurt kültürü 40 °C'de 200 ml süt içinde 3 saat süresince ön canlandırmaya tabi tutulmuştur. Süre sonunda canlandırılan kültür 2,5 litre UHT süte eklenerek 44 °C sıcaklık altında 4 saat fermantasyona bırakılmıştır. Sonrasında 12 saat boyunca buzdolabı sıcaklığında olgunlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

##### 3.2.2. Dövmenin pişirilmesi

Dövmeler şebeke suyu ile yıkandıktan sonra yaklaşık 1:3 (dövme – su) oranında pişirilmiştir. Pişirme işlemine dövme içerisinde beyaz nokta kalmayınca kadar devam edilmiştir.

##### 3.2.3. Tarhana yapımı

*Geleneksel Maraş tarhanası*

Pişirilen dövme ve yoğurt 1:2,5 oranında karıştırılarak fermantasyon sıcaklığına ısıtılmış ve bir mikser yardımıyla hamura homojen bir yapı kazandırılmıştır (Şekil 3.1). Tarhana hamuru 44 °C'de vakum altında 8 saat süresince fermantasyona tabi tutularak

fermantasyon sonunda tarhana hamuru yaklaşık 0,5 cm kalınlıkta olacak şekilde hasırlara serilmiş ve nem miktarı % 10'a düşene kadar 60 °C'de kurutulmuştur.



Şekil 3.1. Tarhana hamuru

#### *Direkt fermente Maraş Tarhanası*

Yoğurt kültürü 40 °C'de 200 ml süt içinde 3 saat süresince ön canlandırmaya tabi tutulmuştur. Pişmiş dövme ve süt 1:2,5 oranında karıştırılarak canlandırılan kültür ile birlikte fermentasyon sıcaklığına ısıtılmıştır. Bir mikser yardımıyla karışımın homojen bir yapı kazanması sağlanmıştır. Tarhana hamuru 44 °C'de vakum altında 4 saat fermentasyona bırakılmış ve fermentasyon sonunda tarhana hamuru buzdolabı sıcaklığında 12 saat olgunlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında tarhana hamuru 44 °C'de vakum altında 8 saat süresince fermentasyona tabi tutulmuştur. Fermentasyon sonunda tarhana hamuru yaklaşık 0,5 cm kalınlıkta olacak şekilde hasırlara serilmiştir. Hamurun nem miktarı % 10'a düşene kadar 60 °C'de kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tarhana hamurunun kurutulması

### 3.2.4. Analizler

#### 3.2.4.1. Tarhana proteinlerinin in-silico sindiriminin modellenmesi

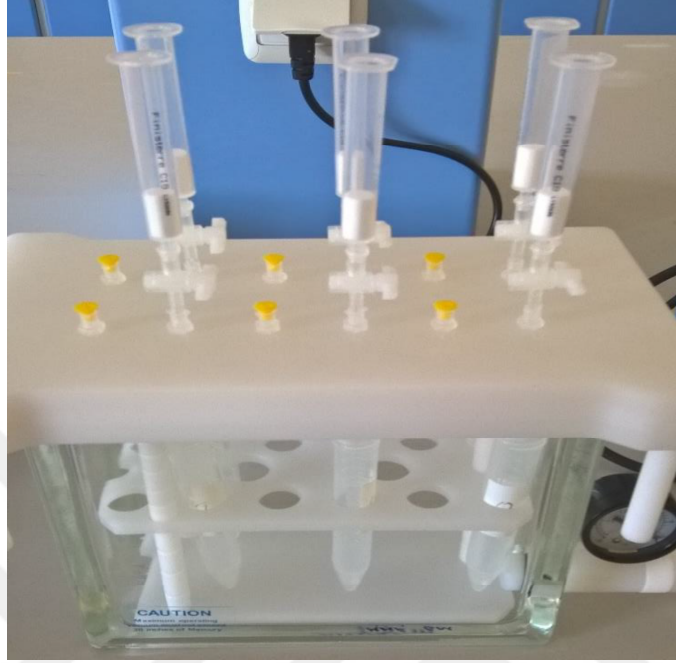
Tarhana proteinlerinin in-silico hidrolizinin modellenmesi BIOPEP programında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yoğurt kaynaklı proteinlerden  $\alpha_{s1}$ -kazein (P02662),  $\alpha_{s2}$ -kazein (P02663),  $\beta$ -kazein (P02666),  $\kappa$ -kazein (P02668),  $\beta$ -laktoglobulin (P02754),  $\alpha$ -laktalbumin (P00711) ve buğday kaynaklı proteinlerden glütenin HMW (P10388), glütenin LMW (P10385),  $\gamma$ -gliadin (P08453),  $\alpha$ - $\beta$ -gliadin (P02863) in silico hidroliz modellenmesi için seçilmiştir. Hidroliz için tripsin (EC 3.4.21.4) ve pepsin (pH>2 EC 3.4.23.1) enzimleri kullanılmıştır. Analizlerde UniProt KB protein veri seti ve BIOPEP peptit veri seti kullanılmıştır.

#### 3.2.4.2. Sıvı kromatografisinde peptit profili analizi

Yoğurt, dövme ve geleneksel-direkt fermente tarhana bileşimindeki suda çözünen azotlu bileşenlerin ekstraktları (WSE) Coda ve ark., (2012)'nin bildirdiği metoda göre elde edilmiştir. Yoğurt, dövme ve öğütülüp 1 mm'lik elekten geçirilen geleneksel ve direkt fermente tarhana örneklerinden 40'ar gr tartılarak 200 ml 50 mM Tris-HCl (pH:8,8) çözeltisiyle seyreltilmiştir. Karışımlar 16 saat süresince 40 °C sıcaklıktaki su banyosunda tutularak suda çözünen azotlu bileşenlerin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda karışımlar 3 saat süresince +4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Bu esnada ekstraktlar yarım saatte bir çalkalanmıştır. Süre sonunda ekstraktlara ait çökeltiler üzerinden alınan sıvılar santrifüjlenerek (15000 x g, 30 dakika) süpernatantlar bir sonraki aşama olan katı faz ekstraksiyonu (SPE) için toplanmıştır.

Ekstraktlarda bulunan peptitlerin katı faz ekstraksiyon işlemi Lubitech (Çin) vakum SPE manifoldu ile Finisterre (İspanya) SPE kolonu (C18, 500 mg/3 ml, 50  $\mu$ m ortalama partikül boyutu) birlikte kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Herraiz ve Casal, 1995). SPE kolonlarında ayırma-saflaştırma işlemi yoğurt, dövme ve tarhana örneklerinin her birisi için 4 adet SPE kolonunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). SPE kolonları sırasıyla 2 ml metanol, 2 ml ultra saf su, 2 ml % 0,1'lik formik asit çözeltisi geçirilerek şartlanmıştır. Ardından kolonlara örneklere ait ekstraktlardan 2 ml aktarılmıştır. Akış hızı dakikada 1 ml olacak şekilde ekstraktlar kolondan geçirilmiştir. Kolonda tutuklanan peptitlerin geri kazanılması için kolondan sırasıyla 2 ml % 0,1'lik formik asit çözeltisi, 2 ml % 0,1'lik formik asit çözeltisi (% 20 asetonitril içinde) ve 2 ml % 0,1'lik formik asit çözeltisi (% 50 asetonitril içinde) geçirilmiştir. Son aşamada kolonlardan alınan sıvılar tek bir kapta toplanarak HPLC

enjeksiyonu öncesinde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonunda örneklere 2 ml ultra saf su ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında bekletilen örnekler filtreden (45 µm x 25 mm PTFE) geçirilerek HPLC'ye 100 µl enjekte edilmiştir.



Şekil 3.3. SPE vakum manifoldu ve SPE (katı faz ekstraksiyon) kolonları

Ekstraktların 214 nm dalga boyundaki kromatogramları Shimadzu LC-20 AT serisi HPLC, Intersil ODS-3 C18 ters faz kolon (250 x 4,6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü, GL Sciences, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. Akış hızı 0,7 ml dk<sup>-1</sup> ve kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak; % 0,1 formik asit – ultra saf sudan (v/v) oluşan A fazı ve % 0,1 formik asit – asetonitrilden (v/v) oluşan B fazı kullanılmıştır (Şanlıdere, 2010). Mobil fazlar için seçilen gradient programı çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mobil faz gradient programı

Zaman (dakika)	Mobil faz	% Miktar
3	A	100
13	A	90
21	A	80
29	A	70
37	A	50
45	A	30
53	A	0
61	A	100

### 3.2.4.3. Kütle Spektrometresi Analizi

Yoğurt, dövme ve geleneksel-direkt fermente tarhana örneklerinin pepsin-tripsin hidrolizatlarının hazırlanması için öncelikle bu örneklerin suda çözünen azotlu bileşenlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu basamak bir önceki bölümde açıklanan WSE işlemi uygulanarak tamamlanmıştır. Elde edilen ekstraktların pepsin-tripsin hidrolizatlarının hazırlanması için ekstraktların pH'ları 1 M HCl ile 2'ye ayarlanmıştır. Enzim substrat oranı 1:50 olacak şekilde ekstraktlara 10 mM HCl içinde hazırlanan pepsin enzimi çözeltisinden (160mg/160ml) 80 ml aktarılmıştır. Hidroliz işlemi çalkalamalı su banyosunda 37 °C sıcaklıkta 24 saatte tamamlanmıştır. Ardından pepsin enzimi aktivitesini sonlandırmak için ekstraktlar 15 dakika boyunca 90 °C'ye ısıtılmıştır. Ekstraktlar bir süre soğuduktan sonra 0,1 N HCl çözeltisi ile pH 8'e ayarlanmıştır. Enzim substrat oranı 1:80 olacak şekilde ekstraktlara 1 mM HCl içinde hazırlanan tripsin enzimi çözeltisinden (100mg/100ml) 50 ml aktarılmıştır. Hidroliz işlemi çalkalamalı su banyosunda 37 °C sıcaklıkta 24 saatte tamamlanmıştır. Hidroliz işlemi sonunda tripsin enzimi aktivitesini sonlandırmak için ekstraktlar 15 dakika boyunca 90 °C su banyosunda tutulmuş ve sonrasında ekstraktlar 20 dakika boyunca buz banyosunda soğutulmuştur. Süre sonunda ekstraktlara ait çökeltiler üzerinden alınan sıvılar santrifüjlenmiş (15000 x g, 30 dakika), ekstraktların süpernatantları için SPE basamağı bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ekstraktlar liyofilizatörde kurutulurken MS analizine kadar -20 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

Kütle spektrometresi analizi Agilent 6545 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS marka ve model cihazda, Mejri ve ark., (2017)'nin belirttiği metoda göre yapılmıştır. Analiz pozitif iyon modunda 100 – 1500  $m/z$  aralığında gerçekleştirilmiştir. ESI jeti parametreleri; fragmentör voltajı 200 V, nebulayzır basıncı 50 psig, kapilar voltaj 3500 V, gaz sıcaklığı 350 °C, gaz akışı 12 lt dk<sup>-1</sup>, skimmer voltajı 60 V, source sheath gaz sıcaklığı ve akışı sırasıyla 400 °C ve 12 lt dk<sup>-1</sup> olarak seçilmiştir. MS/MS otomatik ayarda, 1 prekürsör bir döngü, 2 spektranın ardından dinamik exclusion seçilerek, çarpışma enerjisi her 100 Da kütle için 5 V olarak optimize edilmiştir. Prekürsör kütle tolerans sınırı 10 ppm ve fragment kütle hatası üst sınırı 0,5 Da olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresi verileri PEAKS Studio 8.5 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla programa UniProt KB (Swiss-Prot) veri seti tanıtılarak, metiyonin oksidasyonu, serin fosforilasyonu ve sistein karbamidometilasyonu sonuçların değerlendirilmesindeki değişkenler olarak seçilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken -10logP alt sınırı 15 olarak belirlenmiştir. De-novo sekanslama sonuçlarında % ALC (average local confidence) 70 ve üzeri değerler kabul edilmiştir. Swiss-

Prot veri setinde yer almayan peptitlerin kaynaklarının belirlenmesi amacıyla ScanProsite programından yararlanılmıştır. Tarama yapılacak veri seti olarak UniProt KB (Swiss-Prot ve trEMBL) seçilmiştir. Programın yaptığı protein-amino asit dizisi eşleştirmelerinden yalnızca tam eşleşme olan sonuçlar MS verileriyle birleştirilmiştir. Elde edilen veriler üzerinden BIOPEP programının biyoaktif peptit veri setinde tarama yapılarak eşleşen peptitlere sonuçlarda yer verilmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Tarhana Proteinlerinin In-silico Sindirimi

Tarhana bileşimindeki yoğurt ve buğday kaynaklı proteinlerin pepsin-tripsin enzimleriyle in silico hidrolizi neticesinde ağırlıklı olarak dipeptitler açığa çıkmıştır. Şekil 4.1'de yoğurt proteinlerinin pepsin-tripsin hidroliz modelinin, şekil 4.2'de buğday proteinlerinin pepsin-tripsin hidroliz modelinin BIOPEP programındaki sonuç ekranı sunulmuştur. BIOPEP programının tarama fonksiyonu kullanılarak sonuç ekranlarındaki peptitlerin biyoaktiviteleri taranmıştır. Toplamda 153 adet dipeptitin, 14 adet tripeptitin, 3 adet daha uzun zincirli peptitin biyoaktif özellik taşıdığı görülmüştür (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2). Ortaya çıkan toplam 170 adet peptit fragmenti içinde 68 tanesi birbirinden farklıdır. Bunlardan 39 tanesi tek bir fizyolojik aktiviteye sahipken 29 tanesi çoklu fonksiyon göstermektedir. BIOPEP programından alınan bu sonuçlara göre 42 ACE inhibitör, 47 adet DPP IV inhibitör, 9 adet antioksidant, 1 adet antitrombotik, 2 adet glukoz alımını uyarıcı, 2 adet vazodilatör madde salımını uyarıcı, 1 adet mide mukoz membran aktivitesini düzenleyici, 1 adet anti-amnestik, 1 adet CampDE inhibitör ve 2 adet renin inhibitör peptit fragmenti öncül proteinlerin hidrolizi neticesinde serbest kalmıştır.

Literatürde ACE inhibitör aktivitesiyle öne çıkan ve halihazırda Calpis (Japonya) ve Evolus (Finlandiya) isimleriyle ticarileşmiş formları bulunan (Korhonen, 2009) IPP ve VPP tripeptitleri gibi 3 amino asit veya daha fazla amino asit taşıyan peptit zincirleri in silico modellemede çok sınırlı sayıda açığa çıkmıştır. IPP ve VPP üzerinden örnek verilirse her iki peptit zinciri de in silico analizler için seçilen yoğurt ve buğday proteinleri dizisinde yer almaktadır. Ancak in silico hidroliz için seçilen enzimler ağırlıklı olarak iki amino asitli peptitlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Kütle spektrometresi sonuçlarında da IPP ve VPP tripeptitlerine rastlanmamıştır. In silico modele göre sindirim sistemi enzimleri protein zinciri yapısındaki potansiyel biyoaktif bölgeleri ileri hidrolize uğratarak iki amino asitli dipeptitleri serbest hale geçirmiştir. Biyoaktif zincirlerin çeşitliliği azalsa da kısa peptit zincirleri olan dipeptit ve tripeptitlerin daha reaktif bölgeler olduğu bunun yanında bağırsak duvarından geçmelerinin dolayısıyla dolaşıma dahil olmalarının daha kolay olduğu bildirilmiştir (Maux ve ark., 2015). Kısa peptit zincirleri aynı zamanda gıdaların tat ve acılık gibi duyusal özellikleri üzerindeki etkilerinden ötürü önemli görülmektedir.



**$\alpha$ -s<sub>1</sub> kazein** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-K-L-L-IL-T-CL-VA-VA-L-A-R-PK-HP-IK-HQ-G-L-PQ-E-VL-N-E-N-L-L-R-F-F-VA-PF-PE-VF-G-K-E-K-VN-E-L-SK-D-IG-SE-ST-E-D-Q-A-M-E-D-IK-Q-M-E-A-E-S-SSSE-E-I-VPN-S-VE-Q-K-H-IQ-K-E-D-VPSE-R-Y-L-G-Y-L-E-Q-L-L-R-L-K-K-Y-K--VPO-L-E-I-VPN-SA-E-E-R-L-HSM-K-E-G-IHA-Q-Q-K-E-PM-IG-VN-Q-E-L-A-Y-F-Y-PE-L-F-R-Q-F-Y-Q-L-D-A-Y-PSG-A-WY-Y-VPL-G-T-Q-Y-T-D-A-PSF-SD-IPN-P-IG-SE-N-SE-K-T-T-M-PL-W

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

**$\alpha$ -s<sub>2</sub> kazein** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-K-F-F-IF-T-CL-L-A-VA-L-A-K-N-T-M-E-H-VSSSE-E-S-I-ISQ-E-T-Y-K-Q-E-K-N-M-A-IN-PSK-E-N-L-CST-F-CK-E-V-VR-N-A-N-E-E-E-Y-S-IG-SSSE-E-SA-E-VA-T-E-E-VK-IT-VD-D-K-HY-Q-K-A-L-N-E-IN-Q-F-Y-Q-K-F-PQ-Y-L-Q-Y-L-Y-Q-G-P-I-VL-N-PWD-Q-VK-R-N-A-VP-IT-PT-L-N-R-E-Q-L-ST-SE-E-N-SK-K-T-VD-M-E-ST-E-VF-T-K-K-T-K-L-T-E-E-E-K-N-R-L-N-F-L-K-K-ISQ-R-Y-Q-K-F-A-L-PQ-Y-L-K-T-VY-Q-HQ-K-A-M-K-PW-IQ-PK-T-K-V-IPY-VR-Y-L

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

**$\beta$ -kazein** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-K-VL-IL-A-CL-VA-L-A-L-A-R-E-L-E-E-L-N-VPG-E-I-VE-SL-SSSE-E-S-IT-R-IN-K-K-IE-K-F-Q-SE-E-Q-Q-Q-T-E-D-E-L-Q-D-K-IHPF-A-Q-T-Q-SL-VY-PF-PG-P-IPN-SL-PQ-N-IPPL-T-Q-T-P-V-V-PPF-L-Q-PE-VM-G-VSK-VK-E-A-M-A-PK-HK-E-M-PF-PK-Y-P-VE-PF-T-E-SQ-SL-T-L-T-D-VE-N-L-HL-PL-PL-L-Q-SWM-HQ-PHQ-PL-PPT-VM-F-PPQ-S-VL-SL-SQ-SK-VL-P-VPY-PQ-R-D-M-P-IQ-A-F-L-L-Y-Q-E-P-VL-G-P-VR-G-PF-P-I-I-V

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

**$\kappa$ -kazein** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-M-K-SH-F-L-V-VI-IL-A-L-I-L-PF-L-G-A-Q-E-Q-N-Q-E-Q-P-IR-CE-K-U-E-R-F-F-SD-K-IA-K-Y-IP-IQ-Y-VL-SR-Y-PSY-G-L-N-Y-Y-Q-Q-K-P-VA-L-IN-N-Q-F-L-PY-PY-Y-A-K-PA-A-VR-SPA-Q-IL-Q-WQ-VL-SN-T-VPA-K-SCQ-A-Q-PT-T-M-A-R-HP-HPHL-SF-M-A-IPPK-K-N-Q-D-K-T-E-IPT-IN-T-IA-SG-E-PT-ST-PT-T-E-A-VE-ST-VA-T-L-E-D-SPE-V-IE-SPPE-IN-T-VQ-VT-ST-A-V

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

**$\beta$ -laktoglobulin** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-K-CL-L-L-A-L-A-L-T-CG-A-Q-A-L-I-VT-Q-T-M-K-G-L-D-IQ-K-VA-G-T-WY-SL-A-M-A-A-SD-ISL-L-D-A-Q-SA-PL-R-VY-VE-E-L-K-PT-PE-G-D-L-E-IL-L-Q-K-WE-N-G-E-CA-Q-K-K-I-IA-E-K-T-K-IPA-VF-K-ID-A-L-N-E-N-K-VL-VL-D-T-D-Y-K-K-Y-L-L-F-CM-E-N-SA-E-PE-Q-SL-A-CQ-CL-VR-T-PE-VD-D-E-A-L-E-K-F-D-K-A-L-K-A-L-PM-H-IR-L-SF-N-PT-Q-L-E-E-Q-CH-I

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

**$\alpha$ -laktalbumin** **BIOPEP: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

M-M-SF-VSL-L-L-VG-IL-F-HA-T-Q-A-E-Q-L-T-K-CE-VF-R-E-L-K-D-L-K-G-Y-G-VSL-PE-W-VCT-T-F-HT-SG-Y-D-T-Q-A-I-VQ-N-N-D-ST-E-Y-G-L-F-Q-IN-N-K-IWCK-D-D-Q-N-PHSSN-ICN-ISCD-K-F-L-D-D-L-T-D-D-IM-C-VK-K-IL-D-K-VG-IN-Y-WL-A-HK-A-L-CSE-K-L-D-Q-WL-CE-K-L

[Search for active fragments](#)    [CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V](#)

Şekil 4.1. Yoğurt proteinleri in silico sindiriminin BIOPEP programındaki sonuç ekranı

Results of enzyme action

M - A - K - R - L - VL - F - VA - V - V - VA - L - VA - L - T - VA - E - G - E - A - SE - Q - L - Q - CE - R - E - L - Q - E - L - Q - E - R - E - L - K - A - CQ - Q - VM - D  
- Q - Q - L - R - D - ISPE - CHP - V - V - VSP - VA - G - Q - Y - E - Q - Q - I - V - VPPK - G - G - SF - Y - PG - E - T - T - PPQ - Q - L - Q - Q - R - IF - WG - IPA -  
L - L - K - R - Y - Y - PS - VT - CPQ - Q - VSY - Y - PG - Q - A - SPQ - R - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Y - Y - PT - SPQ - Q - PG - Q - WQ - Q -  
PE - Q - G - Q - PR - Y - Y - PT - SPQ - Q - SG - Q - L - Q - Q - PA - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Y - Y - PT - SSQ - L -  
Q - PG - Q - L - Q - Q - PA - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - A - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q -  
PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - L - Q - G - Q - G - Q - G - Y - Y - PT - SL - Q - Q - SG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SL - Q - Q - L - G - Q - G - Q - SG - Y - Y -  
PT - SPQ - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - L - Q - Q - PA - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q -  
PG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SPQ - Q - SG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SSQ - Q - PT - Q - SQ - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - VG - Q - G - Q - Q - A -  
- Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SPQ - Q - SG - Q - G - Q - PG - Y - Y - L - T - SPQ - Q - SG - Q - G - Q - Q - PG - Q - L - Q - Q -  
SA - Q - G - Q - K - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SPQ - Q -  
SG - Q - G - Q - Q - PG - Q - WQ - Q - PG - Q - G - Q - PG - Y - Y - PT - SPL - Q - PG - Q - G - Q - PG - Y - D - PT - SPQ - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - L -  
Q - Q - PA - Q - G - Q - Q - G - Q - L - A - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PA - Q - VQ - Q - G - Q - R - PA - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q -  
Q - L - G - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PA - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Q -  
Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - G - Q - PWY - Y - PT - SPQ - E - SG - Q - G - Q - Q - PG - Q - WQ - Q - PG - Q - G - Q - PG - Y - Y - L - T - SPL - Q - L - G - Q -  
- G - Q - Q - G - Y - Y - PT - SL - Q - Q - PG - Q - G - Q - Q - PG - Q - WQ - Q - SG - Q - G - Q - HWY - Y - PT - SPQ - L - SG - Q - G - Q - R - PG - Q - WL - Q -  
PG - Q - G - Q - Q - G - Y - Y - PT - SPQ - Q - PG - Q - G - Q - L - G - Q - WL - Q - PG - Q - G - Q - Q - G - Y - Y - PT - SL - Q - Q - T - G - Q - G - Q - Q - SG -  
- Q - G - Q - Q - G - Y - Y - SSY - H - VS - VE - HQ - A - A - SL - K - VA - K - A - Q - Q - L - A - A - Q - L - PA - M - CR - L - E - G - G - D - A - L - SA - SQ

Search for active fragments    CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V

LMW-glütenin

Results of enzyme action

M - K - T - F - L - VF - A - L - L - A - L - A - A - SA - VA - Q - ISQ - Q - Q - Q - A - PPF - SQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - SPF -  
SQ - Q - Q - Q - PPF - A - Q - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - PP - ISQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - PQ - F - SQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - PPF -  
SQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - Q - Q - PPF - T - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - PPF - T - Q - Q - Q - Q - PPF - SQ - Q - Q - PPF -  
ISQ - Q - Q - Q - PPF - L - Q - Q - Q - R - PPF - SR - Q - Q - Q - IP - V - IHP - VL - Q - Q - L - N - PCK - VF - L - Q - Q - Q - Q - Q - IP - VA - M - Q - R - CL - A - R -  
SQ - M - L - Q - Q - S - ICH - VM - Q - Q - Q - CCQ - Q - L - R - Q - IPE - Q - SR - HE - S - IR - A - I - IY - S - I - IL - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q -  
Q - Q - G - Q - S - I - IQ - Y - Q - Q - Q - Q - PQ - Q - L - G - Q - C - VSQ - PL - Q - Q - L - Q - Q - Q - L - G - Q - Q - Q - PQ - Q - Q - Q - L - A - HQ - IA - Q - L - E -  
VM - T - S - IA - L - R - T - L - PT - M - CN - VN - VPL - Y - E - T - T - T - S - VPL - G - VG - IG - VG - VY

Search for active fragments    CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V

γ-gliadin

Results of enzyme action

M - K - T - L - L - IL - T - IL - A - M - A - IT - IG - T - A - N - IQ - VD - PSG - Q - VQ - WL - Q - Q - Q - L - VPQ - L - Q - Q - PL - SQ - Q - PQ - Q - T - F - PQ - PQ - Q -  
- T - F - PHQ - PQ - Q - Q - VPQ - PQ - Q - PQ - Q - PF - L - Q - PQ - Q - PF - PQ - Q - PQ - Q - PF - PQ - T - Q - Q - PQ - Q - PF - PQ - Q - PQ - Q - PF - PQ - T -  
Q - Q - PQ - Q - PF - PQ - Q - PQ - Q - PF - PQ - T - Q - Q - PQ - Q - PF - PQ - L - Q - Q - PQ - Q - PF - PQ - PQ - Q - Q - L - PQ - PQ - Q - PQ - Q - SF - PQ - Q -  
Q - R - PF - IQ - PSL - Q - Q - Q - L - N - PCK - N - IL - L - Q - Q - SK - PA - SL - VSSL - WS - I - IWPQ - SD - CQ - VM - R - Q - Q - CCQ - Q - L - A - Q - IPQ - Q -  
L - Q - CA - A - IHS - V - VHS - I - IM - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - G - ID - IF - L - PL - SQ - HE - Q - VG - Q - G - SL - VQ - G - Q - G - I - IQ - PQ - Q -  
PA - Q - L - E - A - IR - SL - VL - Q - T - L - PS - M - CN - VY - VPPE - CS - IM - R - A - PF - A - S - I - VA - G - IG - G - Q

Search for active fragments    CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V

α-β-gliadin

Results of enzyme action

M - K - T - F - L - IL - VL - L - A - I - VA - T - T - A - T - T - A - VR - F - P - VPQ - L - Q - PQ - N - PSQ - Q - Q - PQ - E - Q - VPL - VQ - Q - Q - Q - F - L - G - Q - Q -  
Q - PF - PPQ - Q - PY - PQ - PQ - PF - PSQ - L - PY - L - Q - L - Q - PF - PQ - PQ - L - PY - SQ - PQ - PF - R - PQ - Q - PY - PQ - PQ - PQ - Y - SQ - PQ - Q - P -  
ISQ - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - Q - IL - Q - Q - IL - Q - Q - Q - L - IPCM - D - V - VL - Q - Q - HN - IA - HG - R - SQ - VL - Q - Q -  
ST - Y - Q - L - L - Q - E - L - CCQ - HL - WQ - IPE - Q - SQ - CQ - A - IHN - V - VHA - I - IL - HQ - Q - Q - K - Q - Q - Q - Q - PSSQ - VSF - Q - Q - PL - Q - Q - Y -  
PL - G - Q - G - SF - R - PSQ - Q - N - PQ - A - Q - G - S - VQ - PQ - Q - L - PQ - F - E - IR - N - L - A - L - Q - T - L - PA - M - CN - VY - IPPY - CT - IA - PF - G -  
IF - G - T - N

Search for active fragments    CALCULATE A<sub>E</sub>, DH<sub>0</sub>, W, B<sub>E</sub>, V

Şekil 4.2. Buğday proteinleri in silico sindiriminin BIOPEP programındaki sonuç ekranı

Çizelge 4.1. Yoğurt proteinlerinin pepsin-tripsin enzimleri ile in silico hidrolizi

Protein	Aktivite	Amino Asit Dizisi	Açıklama
<b><math>\alpha</math>-s<sub>1</sub> kazein</b>	Uyarıcı	IL, VL	Glukoz alımını uyarıcı
	Uyarıcı	VPL, SE	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
	DPP IV inhibitör	HP, IL, IQ, PF, PK, PL, PM, PQ, SK, VA, VE, VF, VL, VN, VPL, WY	
	ACE inhibitör	HP, IG, IL, PL, PQ, ST, VE, VF	
	Antioksidatif	WY	
	Antiamnestik	VPL	Prolyl oligopeptidaz inhibitör
<b><math>\alpha</math>-s<sub>2</sub> kazein</b>	ACE inhibitör	HY, IF, IG, IPY, PQ, PT, ST, VF, VK, VP, VR, VY	
	Antioksidatif	PW, PWD, VY	
	DPP IV inhibitör	HY, IN, IQ, PK, PQ, PT, PW, SK, VA, VD, VF, VK, VP, VR, VY	
	Uyarıcı	SE	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
<b><math>\beta</math>-kazein</b>	Antiamnestik	PG	Prolyl oligopeptidaz inhibitör
	ACE inhibitör	VY, PL, VK, HL, PG, VR, IE, VE, PQ, IL	
	Antioksidatif	HL, PHQ, VY	
	Antitrombotik	PG	
	DPP IV inhibitör	VA, HL, SL, VR, PL, IL, IN, IQ, PF, PG, PK, PQ, SK, VE, VK, VL, VM, VY	
	Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı
<b><math>\kappa</math>-kazein</b>	Uyarıcı	SE	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
	ACE inhibitör	IR, PSY, IA, IP, SG, VR, SF, IE, VE, PT, IL, ST	
	Antioksidatif	IR	
	İnhibitör	IR	CaMPDE inhibitör
	DPP IV inhibitör	VA, PA, IA, VR, WQ, IL, IN, IQ, IR, PF, PT, PY, SF, VE, VL, VQ, VT, IP	
	Hipotansif	IR, SF	Renin inhibitör
<b><math>\beta</math>-laktoglobulin</b>	Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı
	ACE inhibitör	IR, VF, VY, IPA, PL, IA, VR, SF, VE, PT, IL	
	Antioksidatif	WY, IR, VY	
	DPP IV inhibitör	VA, IPA, IA, SL, VR, PL, WY, WE, IL, IQ, IR, PM, PT, SF, VD, VE, VF, VL, VT, VY	
	Hipotansif	IR, SF	
	İnhibitör	IR	CaMPDE inhibitör
<b><math>\alpha</math>-laktalbumin</b>	Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı
	ACE inhibitör	VF, VK, VG, SG, SF, HK, IL, WL, ST	
	DPP IV inhibitör	HA, WL, HT, IL, IM, IN, SF, VF, VG, VK, VQ	
	Hipotansif	SF	Renin inhibitör
	Uyarıcı	IL	Glukoz alımını uyarıcı

Yoğurt proteinlerinin in silico hidroliz modelinde saptanan Val-Leu (VL) ve Ile-Leu (IL) dipeptitleri BIOPEP programı tarafından glukoz alımını uyarıcı peptit olarak tanımlanmıştır. Morifuji ve ark., (2009)'nın çalışmasında da aynı peptitlerin izole L6 miyotüplerinde glukoz alımını arttırıcı etkisinden bahsedilmiştir.

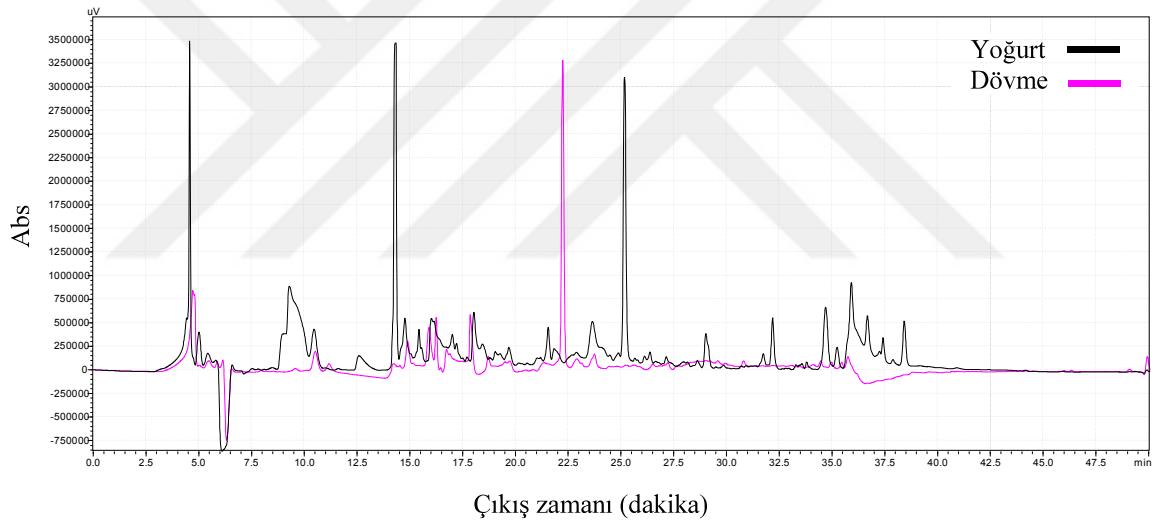
Çizelge 4.2. Buğday proteinlerinin pepsin-tripsin enzimleri ile in silico hidrolizi

Protein	Aktivite	Amino Asit Dizisi	Açıklama
Glütenin HMW	ACE inhibitör	PG, IPA, PR, VSP, IF, VG, WG, SG, SF, VE, PT, WL	
	DPP IV inhibitör	PG, VA, PA, IPA, WG, SF, VE, PT, VL, SL, WL, WQ, PS, VG, VM, VQ, VS, VT	
	Antitrombotik	PG	
	Antioksidatif	WG	
	Hipotansif	SF	Renin inhibitör
	Uyarıcı	VL	Glukoz alımını uyarıcı
	Uyarıcı	SE	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
	Düzenleyici	PG	Mide mukoz membran aktivitesi
	Antiamnestik	PG	Prolyl oligopeptidaz inhibitör
Glütenin LMW	ACE inhibitör	IR, IY, VF, VY, PL, IA, IP, VG, IG, PT, PP, PQ, IL, TF	
	Antiamnestik	VPL	
	Antioksidatif	IR, IY, VY	
	DPP IV inhibitör	PP, VA, VPL, IP, IA, PL, HE, IL, IQ, IR, PF, PQ, PT, VF, VG, VL, VM, VN, VY	
	Hipotansif	IR	Renin inhibitör
	Uyarıcı	VPL	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
	Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı
	İnhibitör	IR	CaMPDE inhibitör
$\gamma$ -gliadin	DPP IV inhibitör	VA, PA, SL, PL, WL, WS, HE, IL, IM, IQ, IR, PF, PQ, SF, SK, VD, VG, VL, VM, VQ, VY	
	ACE inhibitör	VY, PL, IF, VG, IG, SF, PQ, IL, WL, IR	
	İnhibitör	SF, IR	Renin inhibitör
	Antioksidatif	IR, VY	
	İnhibitör	IR	CaMPDE inhibitör
$\alpha$ - $\beta$ -gliadin	Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı
	Antiamnestik	VPL	Prolyl oligopeptidaz inhibitör
	Antioksidatif	HL, VY, IR	
	Uyarıcı	VPL	Vazoaktif madde salımını uyarıcı
	ACE inhibitör	IR, VY, PL, IA, IF, HL, HG, VR, SF, PQ, IL, ST, SF	
	DPP IV inhibitör	VPL, IA, HL, VR, PL, IL, IR, PF, PQ, PY, SF, VL, VQ, VY	
	Hipotansif	IR, SF	Renin inhibitör
	İnhibitör	IR	CaMPDE inhibitör
Uyarıcı	VL, IL	Glukoz alımını uyarıcı	

Nogata ve ark., (2009)'nın buğday kepeğinde tespit ettikleri Thr-Phe (TF) ve Val-Tyr (VY) ACE inhibitör dipeptitleri buğday proteinlerinin in silico hidroliz modelinde de bulunmuştur. VY dipeptitinin BIOPEP programı tarafından aynı zamanda antioksidatif ve DPP IV inhibitör etki taşıdığı öngörülmüştür. Aynı şekilde TF dipeptiti için de ACE inhibitör aktiviteye ek olarak DPP IV inhibitör etki taşıması öngörülmüştür.

#### 4.2. Sıvı Kromatografisinde Peptit Profili Analizi

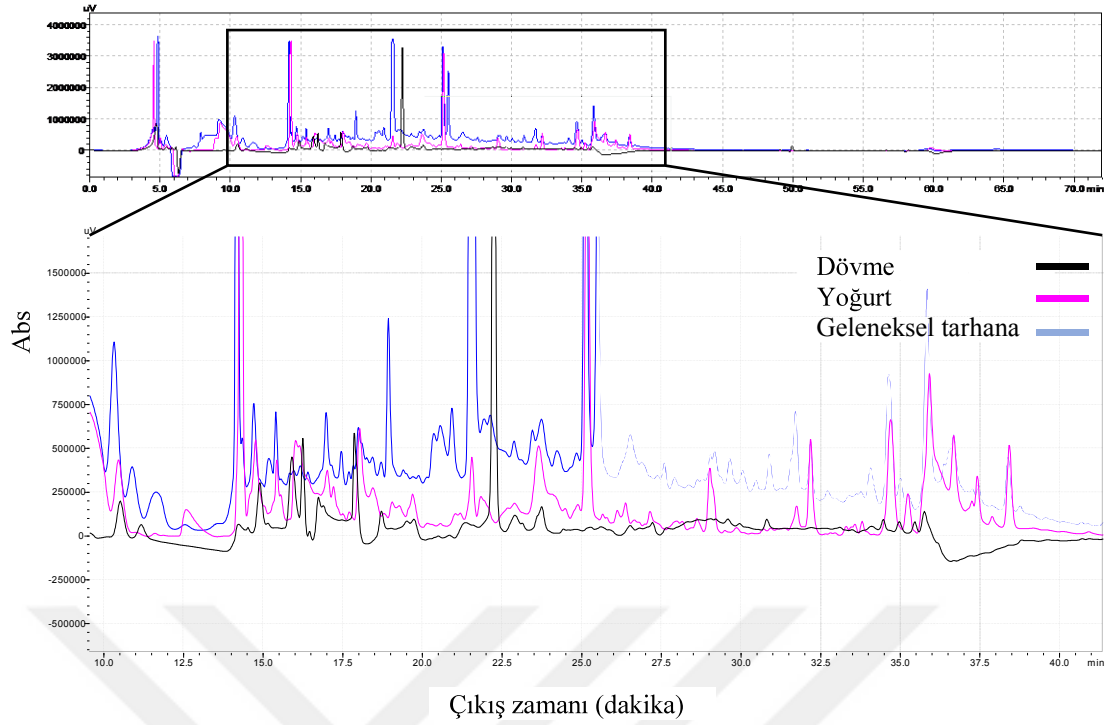
Tarhananın yapımı sürecinde değişen peptit profilinin gözlenmesi amacıyla yoğurt, dövme ve tarhana örneklerinin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Proteinlerin en az düzeyde alt birimlerine parçalanmasının beklendiği dövme örneğinin kromatogramında pik çeşitliliğinin az olduğu, yoğurt örneğinin kromatogramında ise beklendiği gibi pik çeşitliliğinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.3).



Abs: 214 nm dalga boyundaki absorbans (AU)

Şekil 4.3. Yoğurt ve dövme örneklerinin 214 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramları

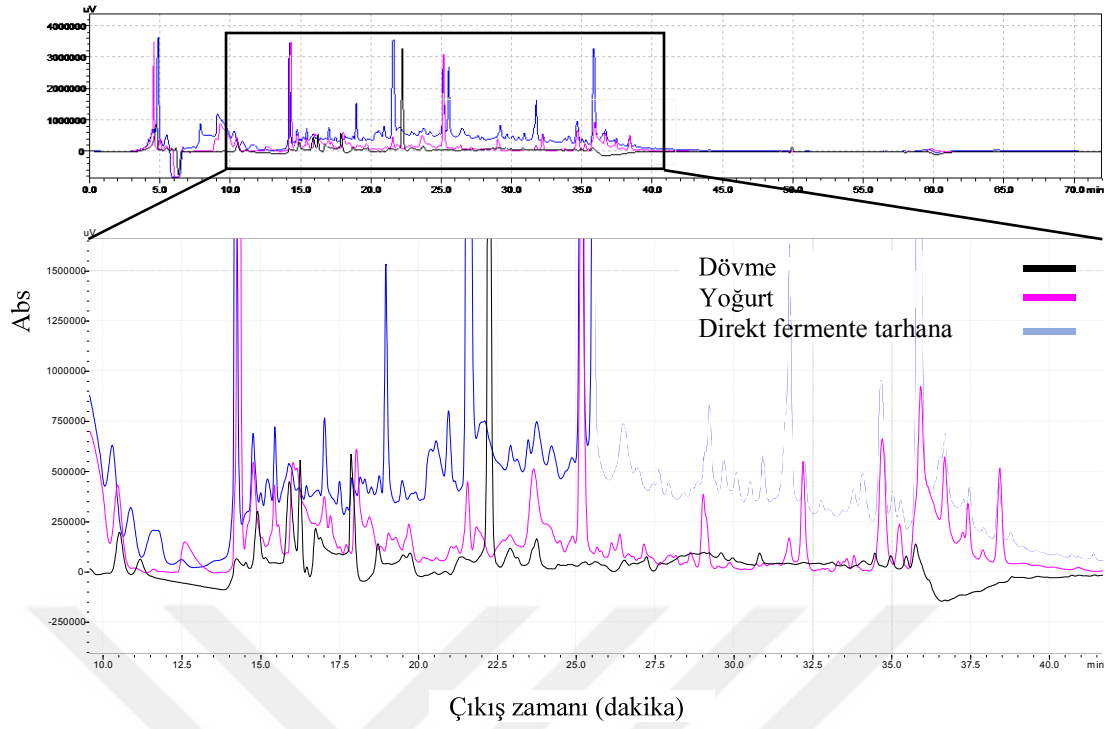
Şekil 4.4'te verilen geleneksel tarhana, yoğurt ve dövme örneklerinin pik profilleri kıyaslandığında tarhana kromatogramındaki piklerin büyük kısmının yoğurt bileşiminden geldiği görülmektedir. Bu durumda tarhana kromatogramında gözlenen piklerin büyük kısmının yoğurt fermantasyonu sırasında açığa çıkan peptit zincirleri olduğu ve tarhana fermantasyonunun piklerin çeşitliliği ve keskinliğine çok fazla katkısının olmadığı söylenebilir.



Abs: 214 nm dalga boyundaki absorbans (AU)

Şekil 4.4. Geleneksel tarhana, yoğurt ve dövmenin kromatogramları

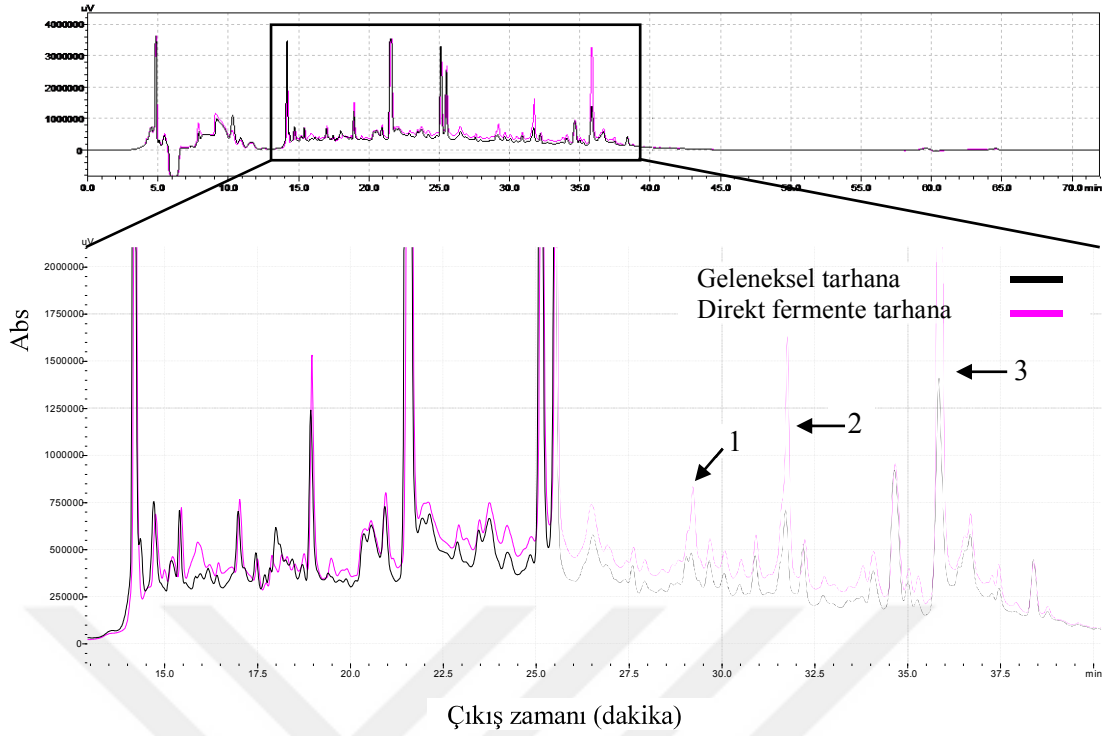
Benzer şekilde direkt fermantasyon tekniği ile üretilen tarhana örneklerindeki piklerin büyük kısmının yoğurt starter kültürlerinin aktivitesinden kaynaklandığı görülmektedir (Şekil 4.5). Şekil 4.6’da verilen kromatogramda görüldüğü gibi geleneksel ve direkt fermente tarhanaların pik profilleri çok büyük oranda benzerdir. Bu durumda üretim metotlarının tarhanaların peptit profilleri üzerinde bir farklılık oluşturmadığı söylenebilir. Yoğurt fermantasyonu esnasında ortaya çıkan peptit alt birimlerinin büyük oranda tarhanaların peptit-protein profilini belirlediği düşünülmektedir. Bununla beraber 1, 2 ve 3 numaralı piklerin alanlarında görülen farklılığın nedeni direkt fermantasyon tekniğinde mikroorganizmaların substrat proteinlere erişimlerinin kısıtlanması olarak yorumlanabilir.



Abs: 214 nm dalga boyundaki absorbans (AU)

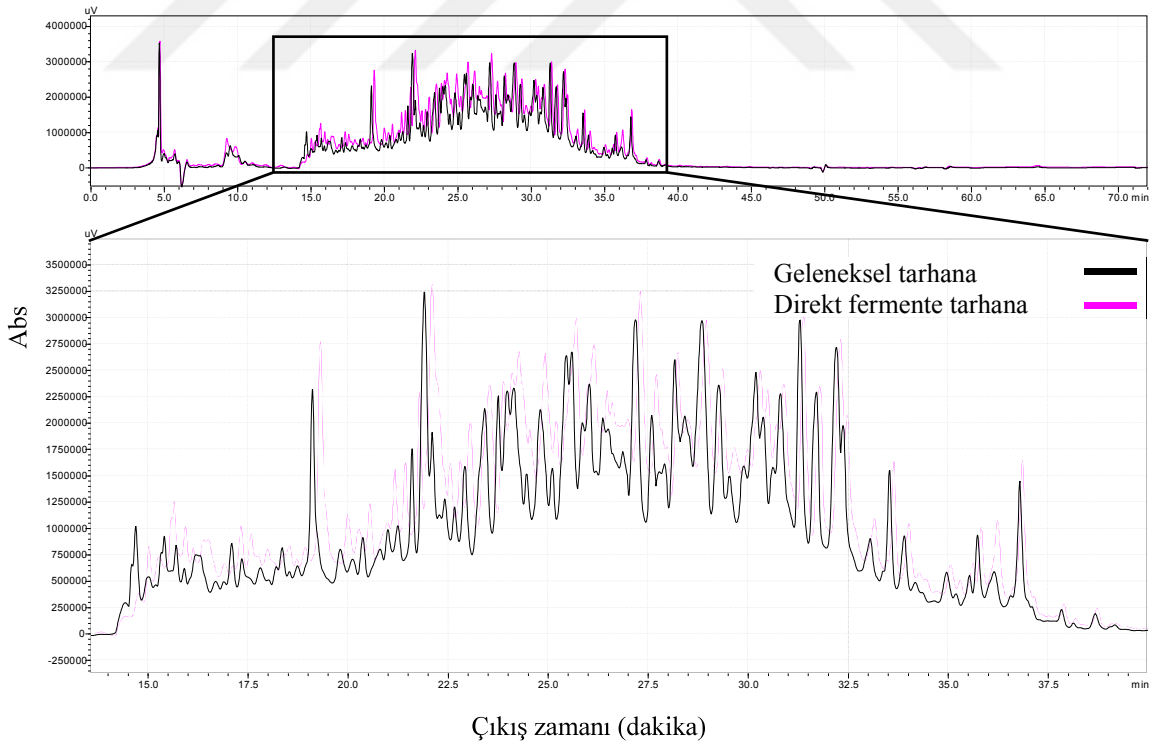
Şekil 4.5. Direkt fermente tarhana, yoğurt ve dövmenin kromatogramları

Geleneksel ve direkt fermente tarhanaların peptit profilleri arasında belirgin bir fark bulunmamaktadır. Öte yandan pepsin-tripsin uygulanan tarhanalar ile pepsin-tripsin uygulanmayanların peptit profilleri arasında beklendiği şekilde önemli fark vardır (Şekil 4.7). Pepsin-tripsin ile muamele edilen tarhanaların kromatogramlarındaki pik sayısı ve pik keskinliği artmıştır. Bununla beraber pepsin-tripsin ile muamele edilen geleneksel ve direkt fermente tarhanaların kendi içinde peptit profilleri arasında önemli fark görülmemiştir.



Abs: 214 nm dalga boyundaki absorbans (AU)

Şekil 4.6. Geleneksel tarhana ve direkt fermente tarhana örneklerine ait kromatogramların karşılaştırılması



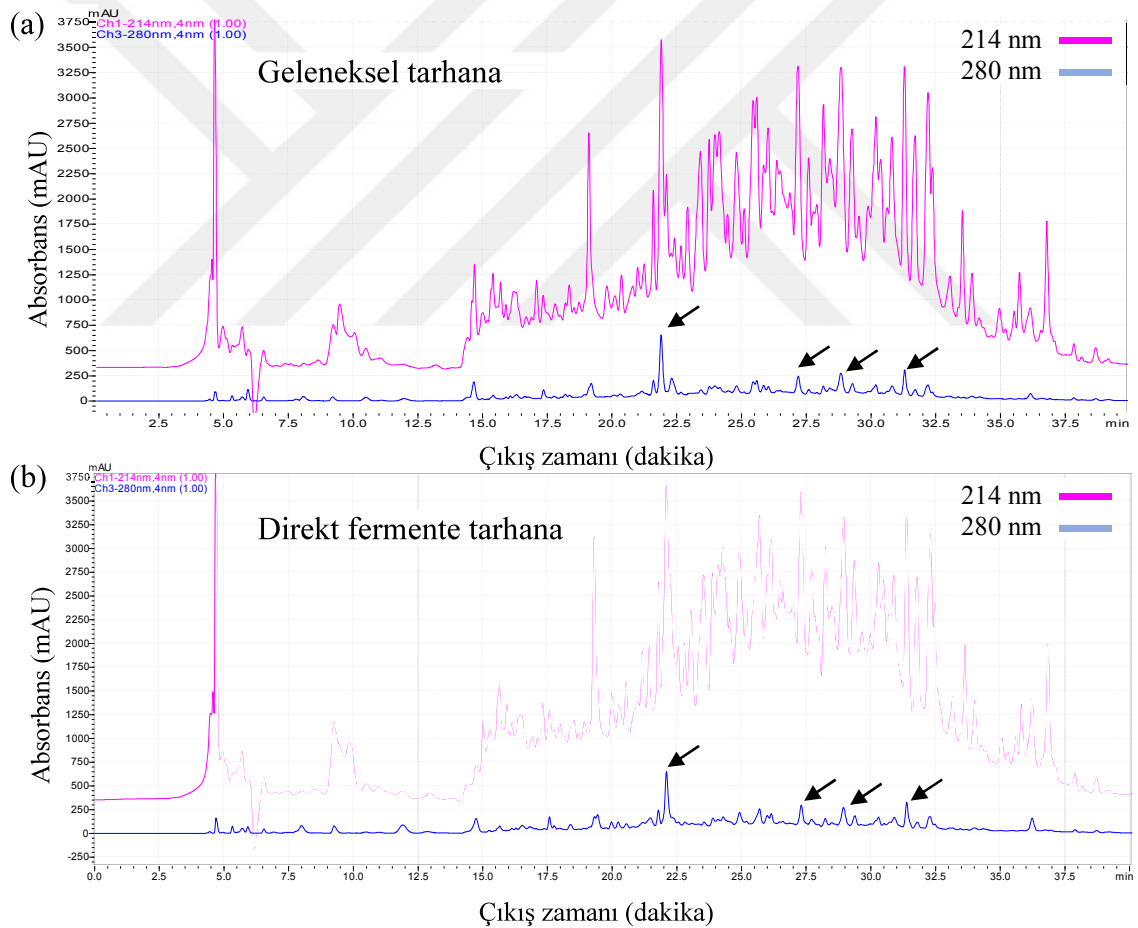
Abs: 214 nm dalga boyundaki absorbans (AU)

Şekil 4.7. Geleneksel ve direkt fermente tarhanaların pepsin (pH:2) ve tripsin (pH:8) hidrolizatlarının kromatogramları



Şekil 4.7’de iki farklı teknikle üretilen tarhanaların hidrolizatlarının 214 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları verilmiştir. Örneklerde çok sayıda peptit zinciri serbest kalmış, kromatogramda oluşan piklerin sayısı ve keskinliği artmıştır. Buna göre seçilen hidroliz modelinin başarılı olduğu ancak geleneksel ve direkt fermente tarhana hidrolizatlarının peptit profilleri arasında belirgin fark olmadığı söylenebilir.

Fenilalanin (F), tirozin (Y) ve triptofan (W) gibi aromatik amino asitlerin bulunduğu kısa peptit zincirleri güçlü ACE inhibitör aktivite taşımaya aday peptit zincirleridir. Bu amino asitlerin maksimum absorbsans yaptığı dalga boyu 280 nm olarak belirtilmiştir (Aguilar, 2004). Şekil 4.8’de verilen kromatogramlarda tarhanaların pepsin-tripsin hidrolizatlarının 214 nm ve 280 nm dalga boyundaki kromatogramları verilmiş, aromatik halkalı amino asitlerin maksimum absorbsans yaptığı pikler gösterilmiştir.



Şekil 4.8. a) Direkt fermente tarhananın pepsin-tripsin hidrolizatının kromatogramı, b) Geleneksel tarhananın pepsin-tripsin hidrolizatının kromatogramı

### 4.3. Kütle Spektrometresi Analizi

#### 4.3.1. Dövme hidrolizatı

Çizelge 4.3 ve çizelge 4.4'te dövme örneğine ait kütle spektrometresi sonuçları verilmiştir. Dövme örneğinin pepsin-tripsin hidrolizatında 23 adet peptit zinciri tanımlanmıştır. Bununla beraber literatürde ve BIOPEP veri setinde tanımlanan peptitlere ait veri bulunamamıştır. Sonuçlarda yer alan LVVPPK peptidine direkt fermente tarhana örneğinde de rastlanmış ancak literatür taramasında ve BIOPEP veri setinde peptit zincirinin herhangi bir fizyolojik aktivite taşıdığı bilgisine ulaşılamamıştır.

Çizelge 4.3. Dövme hidrolizatının kütle spektrometresi sonuçları

Kütle (Da)	-10lgP*	Peptit	Erişim Kodu
859,4664	44,30	AIHNVVHA	P02863 (GDA0_WHEAT)
688,2065	28,11	GGGSSS(+79.97)SA	A0A077RNZ6 (A0A077RNZ6_WHEAT)
977,3460	27,90	CKCSS(+79.97)SRQ	AKB**
1046,5793	25,91	MQKSIEALK	AKB
949,3473	21,14	CS(+79.97)CMVKSL	AKB
716,2014	20,84	GDGSS(+79.97)SQ	P29557 (IF4E1_WHEAT)
977,3426	20,76	CS(+79.97)GRGNFSA	AKB
787,2993	20,07	CSCANKY	AKB
716,2014	19,78	GSSDS(+79.97)GQ	A0SPJ3 (NAMA1_TRITD)
949,3542	19,34	DIHGGGS(+79.97)DL	AKB
884,4538	19,25	HVEVM(+15.99)VR	AKB
977,3413	17,46	CSVSSS(+79.97)SLE	AKB
783,5218	16,56	VIGVVIGK	P49232 (PROF1_WHEAT)
688,2065	16,35	NS(+79.97)GSSSA	AKB
1156,6274	16,32	IVNGMVKPGDK	P27736 (SSG1_WHEAT)
977,3500	16,14	CGRCSPLY(+79.97)	Q37680 (NU5M_WHEAT)
850,2568	15,78	VGS(+79.97)DGACY	Q9AUJ7 (IF4B1_WHEAT)
878,2517	15,41	PDGTSCGY(+79.97)	Q3I411 (G3O21_WHEAT)

\*-10 lgP: Hatalı eşleşme olasılığı (%1 hatalı eşleşme ihtimali -10lgP:20 değerine denktir)

\*\* AKB: Anlamli kaynak bulunamadı

Literatürde buğday ve buğdaydan elde edilen fermente ürünlerin peptit içeriklerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (Nakamura ve ark., 2007; Jeong ve ark., 2007; Rizzello ve ark., 2008; Nogata ve ark., 2009; Kancabaş ve Karakaya, 2012; Zhao ve ark., 2013). Bununla beraber bahsedilen çalışmalarda saptanan peptitler bizim çalışmamızda tespit edilememiştir.

Çizelge 4.4. Dövme hidrolizatının kütle spektrometresi de-novo sonuçları

Peptit	% ALC*	Kütle (Da)
LSSKA	94	504,2907
EELR	96	545,2809
LVVPPK	91	651,4319
LSASK	85	504,2907
VLVPPK	84	651,4319

\*% ALC: Sekanstaki amino asitlerin doğruluk yüzdesi

#### 4.3.2. Yoğurt hidrolizatı

Çizelge 4.5 ve çizelge 4.6’da yoğurt örneği hidrolizatının kütle spektrometresi analizi sonuçları verilmiştir. Kütle spektrometresinde tanımlanan peptitler BIOPEP veri setinde taranmış, yalnızca antioksidatif etki gösteren VLPVPQK peptiti için eşleşme bulunmuştur. Bunun yanında EAMAPK peptitinin antioksidatif etki taşıdığına dair literatür bilgisine ulaşılmıştır (Pepe ve ark., 2016). Her iki peptite geleneksel ve direkt fermente tarhana örneklerinde de rastlanmıştır. Bununla beraber kütle spektrometresi sonuçlarında yoğurt proteinlerinin pepsin-tripsin enzimleriyle in silico sindirimi sonucunda öngörülen peptitlere rastlanmamıştır.

Çizelge 4.5. Yoğurt hidrolizatının kütle spektrometresi sonuçları

Kütle (Da)	-10lgP*	Peptit	Erişim Kodu
753,4459	21,50	VPVPMPL	A4FUB8 (TM115_BOVIN)
747,3625	21,46	LFPM(+15.99)PGA	Q1LZD1 (TM102_BOVIN)
779,4905	20,52	VLPVPQK	P02666 (CASB_BOVIN)
753,4497	18,32	IALPANR	P56658 (ADA_BOVIN)
788,4280	17,85	LAEVETK	Q3SYU9 (MVP_BOVIN)
645,3156	17,37	LSMAPGA	Q5E9L7 (VPS16_BOVIN)
747,3585	15,33	SKSCVPGA	Q1RMQ4 (LYNX1_BOVIN)
686,3599	15,25	TIPASAGA	P13608 (PGCA_BOVIN)

\*-10 lgP: Hatalı eşleşme olasılığı (%1 hatalı eşleşme ihtimali -10lgP:20 değerine denktir)

\*\* AKB: Anlamli kaynak bulunamadı

Çizelge 4.6. Yoğurt hidrolizatının kütle spektrometresi de-novo sonuçları

Peptit	% ALC*	Kütle (Da)
KVPQ	94	470,2853
HLQK	93	524,3071
MAPK	92	445,2359
HPLK	87	493,3012
LLAEK	87	572,3533
TVPKA	86	514,3115
VCPK	85	445,2359
ALEK	84	459,2693
TVMAPQ	79	645,3156
EAMAPK	78	645,3156
DLK	75	374,2165

\*% ALC: Sekanstaki amino asitlerin doğruluk yüzdesi

Yoğurt bileşiminde bulunan biyoaktif peptitlere ve bunların fizyolojik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalara literatürde sıkça rastlanmaktadır (Donkor ve ark., 2007; Plaisancie ve ark., 2013; Jin ve ark., 2016; Sah ve ark., 2016). Bu çalışmada yoğurt örneklerinde saptanan antihipertansif VLPVPQK peptiti Kunda ve ark., (2012)'nin yoğurt ile yaptıkları çalışmada da tespit edilmiştir. Öte yandan VPP ve IPP gibi etkileri iyi tanımlanmış antihipertansif peptitler ve kazeisin A (IKHQGLPQE) ve israsidin (RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF) gibi iyi bilinen antimikrobiyal peptitler yoğurt hidrolizatında bulunamamıştır.

#### 4.3.3. Tarhana hidrolizatları

Çizelge 4.7'de sunulan kütle spektrometresi verilerinin PEAKS Studio programı kullanılarak değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlara göre geleneksel tarhana örneklerinde 34 farklı peptit zinciri, direkt fermente tarhana örneklerinde 50 farklı peptit zinciri açığa çıkmıştır. ScanProsite programında gerçekleştirilen protein-amino asit sekansı eşleştirmeleri 75 peptit zinciri için sonuç vermiş, 9 peptit zinciri için anlamlı kaynak protein bulunamamıştır. Kaynak proteinlerin UniProt KB veri seti erişim kodları çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kütle spektrometresi verilerinin PEAKS Studio programında değerlendirilmesi

Örnek	Kütle (Da)	-10lgP*	Peptit	Erişim Kodu
Geleneksel Tarhana	673,4163	24,06	IPAVFK	P02754 (LACB_BOVIN)
	673,4163	24,06	LPAVFK	Q58DW0 (RL4_BOVIN)
	645,3156	19,23	EAMAPK	P02666 (CASB_BOVIN)
	473,2962	18,39	GGC(-2.95)KL	A6QLB5 (A6QLB5_BOVIN)
	645,3156	17,22	KDCPAL	A0A1D5U880 (A0A1D5U880_WHEAT)
	671,2762	17,17	DSSC(-2.95)TY	F1MFL0 (F1MFL0_BOVIN)
	829,4446	16,43	AVPYPQR	P02666 (CASB_BOVIN)
	512,3071	16,02	AAPVR	A0A077RWI5 (A0A077RWI5_WHEAT)
	673,4163	15,83	IAPVFK	AKB**
	673,4163	15,83	LAPVFK	AKB
	779,4905	15,48	VLPVPQK	P02666 (CASB_BOVIN)
	932,5365	15,23	LIVTQTMK	P02754 (LACB_BOVIN)
	932,5365	15,23	IIVTQTMK	P02755 (LACB_BUBBU)
Direkt Fermente Tarhana	932,5365	23,58	IIVTQTMK	P02755 (LACB_BUBBU)
	932,5365	23,58	LIVTQTMK	P02754 (LACB_BOVIN)
	673,4163	22,80	IPAVFK	P02754 (LACB_BOVIN)
	673,4163	22,80	LPAVFK	Q58DW0 (RL4_BOVIN)
	645,3156	21,50	EAMAPK	P02666 (CASB_BOVIN)
	673,4163	19,35	APLVFK	A0A077RPE6 (A0A077RPE6_WHEAT)
	673,4163	19,35	APIVFK	AKB
	747,3659	18,21	EMMIPK	AKB
	747,3659	18,21	EMMLPK	Q29RT4 (CDCA2_BOVIN)
	673,4163	17,36	APIVKF	A0A0B8QNF2 (A0A0B8QNF2_LACLL)
	673,4163	17,36	APLVKF	AKB
	829,4480	16,63	AVM(+15.99)LPGAR	F1MKX7 (F1MKX7_BOVIN)
	673,4163	16,52	LPGIKF	A0A0R2GUS0 (A0A0R2GUS0_9LACO)
	673,4163	16,52	LPGLKF	W5BHC7 (W5BHC7_WHEAT)
	572,3533	16,38	LLSLGA	P24627 (TRFL_BOVIN)
	473,2962	15,88	C(-2.95)GAVK	AKB
	779,4905	15,74	VLPVPQK	P02666 (CASB_BOVIN)
	572,3533	15,65	IIVTQ	AKB
	572,3533	15,65	LIVTQ	A0A0M4FI60 (A0A0M4FI60_BOVIN)
	572,3533	15,65	LLVTQ	A7MBJ5 (CAND1_BOVIN)
	572,3533	15,65	ILVTQ	AKB
	512,3071	15,64	APAVR	AKB
	655,3653	15,51	SC(-2.95)KPPQ	G5E6Q3 (G5E6Q3_BOVIN)
677,3496	15,19	KPDYR	Q88VP9 (PRMA_LACPL)	
572,3533	15,08	LLTVQ	A0A077RWX9 (A0A077RWX9_WHEAT)	
572,3533	15,08	LITVQ	A0A096UUP1 (A0A096UUP1_WHEAT)	
572,3533	15,08	ILTVQ	Q0VD51 (RNF13_BOVIN)	
572,3533	15,08	IITVQ	Q58D55 (BGAL_BOVIN)	
747,3625	15,07	EMFPFK	P02666 (CASB_BOVIN)	

\*-10 lgP: Hatalı eşleşme olasılığı (%1 hatalı eşleşme ihtimali -10lgP:20 değerine denktir)

\*\* AKB: Anlamli kaynak bulunamadı

Çizelge 4.7’de verilen peptit zincirleri BIOPEP programında taranarak biyoaktivite gösteren peptit zincirleri ve gösterdikleri aktivite çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Buna göre IPAVFK ve VLPVPQK peptit zincirleri her iki tarhana örneğinde de tespit edilmiştir. AVPYQR peptit zinciri ise yalnızca geleneksel tarhana örneklerinde tespit edilirken LIVTQ ve EMPFPK peptit zincirleri de yalnızca direkt fermente tarhana örneklerinde tespit edilmiştir. Buna göre her iki tarhana örneğinin de antibakteriyal, antioksidant ve ACE inhibitör aktivite gösteren en az bir peptit zinciri içerdiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8. PEAKS Studio programı çıktılarının BIOPEP veri setindeki tarama sonuçları

Peptit sekansı	Aktivite	Teorik kütle (Da)	Ölçülen kütle (Da)	Tarhana çeşidi
IPAVFK	Antibakteriyel, DPP IV inhibitör, ACE inhibitör	673,4030	673,4163	Geleneksel, Direkt fermente
AVPYQR	ACE inhibitör, antioksidatif	829,4310	829,4446	Geleneksel
VLPVPQK	Antioksidant	779,4760	779,4905	Geleneksel, Direkt fermente
LIVTQ	ACE inhibitör	572,3410	572,3533	Direkt fermente
EMPFPK	ACE inhibitör	747,3484	747,3625	Direkt fermente

PEAKS Studio programının de-novo peptit sekanslama özelliği kullanılarak programa tanıtılan protein veri setinde yer almayan peptit zincirlerinin de tanımlanması sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. PEAKS Studio programının de-novo sekanslama sonuçları

Örnek	Peptit	% ALC*	Kütle (Da)
<b>Geleneksel Tarhana</b>	LLAEK	89	572,3533
	KLPQ	88	484,3009
	LPAVKF	87	673,4163
	LQPK	84	484,3009
	LKPQ	83	484,3009
	LR	82	287,1957
	MALPPK	79	655,3727
	VLPVKPQ	76	779,4905
	LLAKE	75	572,3533
	LLR	74	400,2798
	LKGPA	74	484,3009
	LAR	73	358,2328
	VLPVPC(-2.95)R	73	779,5018
	LLAEK	72	572,3533
	ALR	72	358,2328
	RL	71	287,1957
	LAK	71	330,2267
	LKPGA	71	484,3009
	FR	70	321,1801
	VR	70	273,1801
LLTVQ	70	572,3533	
<b>Direkt Fermente Tarhana</b>	LLAEK	90	572,3533
	LPAVKF	87	673,4163
	ALPPK	85	524,3322
	GVSK	85	339,2274
	LQPK	84	484,3009
	LKPQ	83	484,3009
	VR	80	273,1801
	LAPPK	79	524,3322
	LR	78	287,1957
	TVMAPQ	76	645,3156
	LVVPPK	76	651,4319
	KLPQ	76	484,3009
	FR	76	321,1801
	MALPPK	75	655,3727
	LLR	75	400,2798
	LAR	75	358,2328
	CVLPPK	74	655,3727
	ALR	74	358,2328
	LAK	73	330,2267
	VLR	72	386,2641
HQ	70	283,1281	

\*% ALC: Sekanstaki amino asitlerin doğruluk yüzdesi

Çizelge 4.9’da verilen peptit zincirleri BIOPEP programında taranmıştır. Veri setinde bulunan peptit zincirleri ve gösterdikleri aktivite çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. PEAKS Studio de-novo sekanslama sonuçlarının BIOPEP veri setindeki tarama sonuçları

Peptit sekansı	Aktivite	Teorik kütle (Da)	Ölçülen kütle (Da)	Tarhana çeşidi
FR	ACE inhibitör, DPP IV inhibitör	321,1690	321,1801	Geleneksel, Direkt fermente
VR	ACE inhibitör, DPP IV inhibitör	273,1690	273,1801	Geleneksel, Direkt fermente
RL	ACE inhibitör, DPP IV inhibitör	287,1850	287,1957	Geleneksel
LR	Renin inhibitör, ACE inhibitör	287,1850	287,1957	Geleneksel, Direkt fermente
LLR	Antioksidant	400,2690	400,2798	Geleneksel, Direkt fermente

LR, VR, FR ve LLR peptit zincirleri her iki tarhana örneğinde de tespit edilmiştir. RL dipeptiti ise yalnızca geleneksel tarhana örneklerinde tespit edilmiştir. Buna göre her iki tarhana örneği de Antioksidatif, renin inhibitör, ACE inhibitör ve DPP IV inhibitör aktivite gösteren peptit zincirleri içermektedir.

Kütle spektrometresi sonuçlarının PEAKS Studio programında yorumlanması ile elde edilen peptitler, BIOPEP programından elde edilen in-silico sindirim modelinden elde edilen peptitlerle kıyaslandığında ACE inhibitör ve DPP IV inhibitör aktivite gösteren VR dipeptiti dışında ortak bir sonuç bulunamamıştır. In silico analiz modelinde öngörülen dipeptitlerin deneysel çalışmada tespit edilememesinin sebeplerinden birisi yeterli hidroliz derecesine erişilememesi olabilir. Bir diğer nedenin ise gıdaların kompleks kimyasal yapısı olduğu söylenebilir. Nitekim in silico analiz için programa yalnızca protein türleri tanımlanarak teorik bir sonuç alınmaktadır. Bununla beraber tarhana örnekleri için in silico hidroliz modeli ve deneysel hidroliz çalışması neticesinde açığa çıkan peptitlerin fizyolojik aktiviteleri çizelge 4.11’de kıyaslanmıştır.



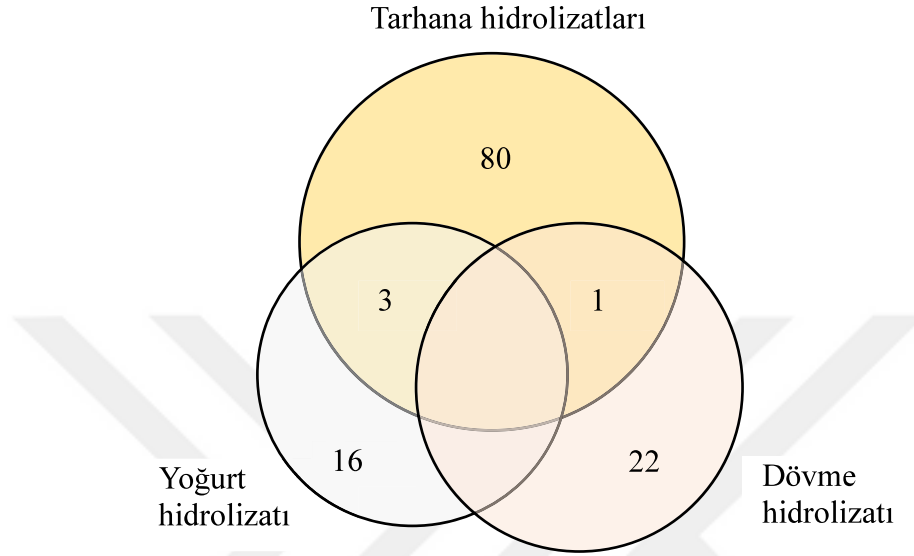
Çizelge 4.11. Tarhana proteinlerinin in silico ve deneysel hidroliz sonuçlarının kıyaslanması

Fizyolojik aktivite	In silico hidroliz		Deneysel hidroliz	
	Yoğurt	Buğday	Geleneksel yöntem	Direkt fermantasyon
Antioksidatif etki	+	+	+	+
Antibakteriyel etki	+	+	+	+
Renin inhibitör	+	+	+	+
ACE inhibitör aktivite	+	+	+	+
DPP IV inhibitör aktivitesi	+	+	+	+
Antitrombotik etki	+	+	-	-
Glukoz alımını uyarıcı	+	+	-	-
Antiamnestik	+	+	-	-
CampDE inhibitör	+	+	-	-
Vazoaktif madde salımını uyarıcı	+	+	-	-
Mide mukoz membran aktivitesi düzenleyici	+	+	-	-

BIOPEP veri setinde kayıtlı olmayan peptitlerden EAMAPK, Pepe ve ark., (2016)'nın çalışmasında antioksidatif peptit olarak geçmektedir. Veri setinde yer almayan bir diğer peptit zinciri IIVTQTMK Chobert ve ark., (2005)'nin çalışmasında ACE inhibitör peptit olarak tanımlanmıştır. Bunların yanında veri setlerinde ve literatürde yer almayan LPAVFK, LPGLKF, LLSLGA, LVVPPK peptit zincirleri amino asit içerikleri yönünden incelenmeye değer görülmüştür. Dziuba ve Dziuba (2014)'nin belirttiğine göre prolin, lösin, valin, glutamik asit ve trionin amino asitleri istatistiksel olarak tanımlanmış antimikrobiyal peptit zincirleri içinde baskın şekilde bulunmaktadır. Bu anlamda yukarıda verilen dört peptit zincirinin antimikrobiyal aktivite taşımaya aday peptit zincirleri olduğu söylenebilir.

Conway ve ark., (2013)'nin hazırladıkları antioksidatif etki puan tablosuna göre bizim çalışmamızda tespit edilen IAPVFK, LAPVFK, APIVKF ve VLPVKPQ peptit zincirlerinin antioksidant aktivite taşımaya aday peptitler olduğu söylenebilir. Söz konusu peptitlerin antioksidatif etki puanları sırasıyla 7, 6,5, 7 ve 7 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen antioksidant peptit zinciri VLPVPQK için ise bu değer 7,5 puan olarak bulunmuştur.

Tarhana örnekleri, yoğurt ve dövmede ortak tanımlanan peptitler şekil 4.9'da sunulmuştur. EMMAPK, LAEK, TVMAPQ peptitlerinin yoğurt ve tarhana, LVVPPK peptitinin dövme ve tarhanada ortak bulunduğu saptanmıştır. Öte yandan her üç örnekte ve yoğurt ile dövme arasında ortak bulunan peptit zincirlerine rastlanmamıştır.



Şekil 4.9. Tarhana, yoğurt ve dövme hidrolizatlarında ortak bulunan peptitler

Tarhana hidrolizatları ile kıyaslandığında yoğurt ve dövme hidrolizatlarında tespit edilen peptit sayısı daha azdır. Direkt fermente tarhana örneğinin hidrolizatında 50, geleneksel tarhana hidrolizatında 34, yoğurt hidrolizatında 19 ve dövme hidrolizatında 23 farklı peptit zinciri tespit edilmiştir. Saptanan peptitler açısından tarhana örneklerinin daha zengin bir kaynak oluşturması laktik asit bakterileri ve mayaların tarhana fermantasyonu esnasındaki hücre dışı proteolitik enzim aktivitesi ile açıklanabilir (Pritchard ve Coolbear, 1993). Yoğurt kaynaklı mikroorganizmalar buğdaydan gelen kısa zincirli şekerlere erişim sağlayarak gelişebilmektedir. Buğday tanesi karbonhidratlarının çok büyük bölümü (% 65-75) nişasta yapısında olsa da monosakkarit (glukoz, fruktoz) ve disakkaritler (sukroz, maltoz) % 1 oranında, oligosakkaritler (rafinoz, frukto oligosakkarit) % 1 oranında, fruktan % 1-2 oranında buğday tanesi karbonhidratları içinde yer almaktadır (Lafandra ve ark., 2014). Hücre metabolizmasına katılması kolay olan bu şekerlerin hücrelerin gelişmesini teşvik ederek proteolitik parçalanmaya katkı sağladığı böylece tarhana yapısında yoğurt ve dövmeye kıyasla daha fazla peptit açığa çıkabildiği söylenebilir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada tarhana fermantasyonu ve enzim hidrolizi neticesinde serbest kalan peptit zincirleri içinde fizyolojik aktivite gösterdiği deneysel olarak tespit edilmiş 8 ACE inhibitör peptit, 3 antioksidant peptit, 1 antibakteriyal peptit, 4 DPP IV inhibitör peptit, 1 renin inhibitör peptit zinciri tespit edilmiştir. Kütle spektrometresi ile tanımlanan peptitler BIOPEP programının in silico sindirim modelinde öngördüğü peptitlerle çok büyük oranda eşleşmemiştir. BIOPEP programında öngörülen ve ağırlıklı olarak dipeptitlerin oluşturduğu (153 dipeptit, 14 tripeptit) biyoaktif peptit zincirlerinden yalnızca bir tanesi (VR) yaptığımız deneysel çalışmada tespit edilmiştir. Benzer şekilde ACE inhibitör aktiviteye sahip PL dipeptidine ise % ALC skoru 70'in altında kaldığı için sonuçlarda yer verilmemiştir.

Geleneksel ve direkt fermente tarhana hidrolizatlarında tespit edilen peptit zincirleri hem sayısal anlamda hem de tespit edilen peptitler açısından farklılık gösterse de her iki teknikle üretilen tarhanaların aynı fizyolojik etkilere sahip peptit zincirleri içerdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak her iki teknikle üretilen tarhana örneklerinde de ACE inhibitör, DPP IV inhibitör, renin inhibitör, antioksidant, antibakteriyal aktivite gösteren peptit zincirleri bulunmaktadır.

Yoğurt hidrolizatında saptanan peptitlerden olan VLPVPQK ve EAMAPK peptit zincirlerinin literatürde antioksidatif aktivitesi tanımlanmıştır. Dövme hidrolizatında saptanan peptitlerle ilgili literatür bilgisine ulaşamamıştır.

Yoğurt ve buğdayda saptanan peptitlerin büyük kısmı tarhana örneklerinde bulunamamıştır. Bu nedenle tarhana fermantasyonunun 3 kDa altındaki peptitlerin serbest kalması açısından önemli bir basamak olduğu söylenebilir. Örneklerde saptanan peptitler fizyolojik aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde de tarhana örneklerinde daha fazla sayıda fizyolojik aktivite gösteren peptit bulunmaktadır.

Tarhana proteinlerinin in silico sindirim modelinde ortaya çıkan iki veya üç amino asitten oluşan peptitler deneysel çalışmada saptanamamıştır. Bu durum yeterli hidroliz derecesine erişilememesi veya ortamdaki mikroorganizmaların kısa peptit zincirlerini metabolik faaliyetlerine dahil etmelerinden kaynaklanabilir. Bu nedenle tarhana proteinlerinin öncelikle tamamen izole edilmesi ve yeterince saflaştırılması deneysel çalışmalar için daha faydalı olacaktır. Buna ek olarak yoğurt benzeri ürünler için pH 4,5

dolaylarında kısa peptit zincirlerinin mikrobiyal hidrolizden daha az etkilendikleri, biyoaktif peptitlerle zenginleştirme yapılacaksa bu şartlar altında yapılabileceği düşünülmektedir.

Tarhana bileşiminde yoğurdun yapısından gelen mikroorganizmalar ve buğdayın yapısından gelen galakto-frukto oligosakkaritler ve diyet lifleri birlikte bulunur. Bu anlamda tarhana probiyotik-prebiyotik (sinbiyotik) konseptine kendiliğinden dahil olan gıdalardan birisidir. Buna ek olarak geleneksel Maraş tarhanası üretim tekniğinde diğer bazı yörelerde yapıldığı şekilde yoğurt kaynatılmamaktadır. Böylece yoğurdun yapısından tarhanaya geçen faydalı mikroorganizmaların sayısı daha fazla olmaktadır. Bu durum Maraş tarhanasının fonksiyonel ürün kimliğine önemli katkı sağlamaktadır. Bununla beraber proteolitik aktivitesi yüksek olduğu bilinen *Lactobacillus helveticus* gibi laktobasiller tarhana fermantasyonuna dahil edilirse iki veya üç amino asitli farklı biyoaktif peptit zincirlerinin açığa çıkmasına katkı sağlayabilir. Böyle bir çalışma tarhananın fonksiyonel özelliğini arttırabilir. Nitekim iki-üç amino asitten oluşan kısa zincirli peptitlerin fizyolojik açıdan daha aktif olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada tarhana örneklerinin kütle spektrometresi analizinde saptanan peptitlerin biyoaktif peptit veri setinde yer alıp almadığı araştırılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda veri setinde bulunduğu saptanan peptitlerin izolasyonunun gerçekleştirilmesi ve bu peptitlerin aktivitelerinin in-vivo şartlarda ölçülmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla sonraki çalışmalardaki analizlerin HPLC kromatogramlarından seçilen piklerin üzerinden yürütülmesi daha faydalı görünmektedir.

Günümüzde tüketicilerin talepleri doğrultusunda doğal gıda katkı maddelerinin kullanım olanakları üzerinde önemli araştırmalar yürütülmektedir. Gıda katkı maddesi olarak kullanılabilen nisin peptiti gibi özellikle antibakteriyal ve antioksidant peptitlerin gıdaların korunmasında ve insan sağlığını destekleyici ürünlerin geliştirilmesinde kullanımlarının sağlanması tüketicilerin doğal-sağlıklı gıda talebine cevap vermeye yönelik faydalı bir çalışma olacaktır. Bu anlamda çalışmamızda saptanan ancak biyoaktif veri setinde yer almayan peptitlerin izole edilerek aktivitelerinin incelenmesi sonucunda koruyucu ve sağlığı destekleyici özellikler taşıyan peptitler saptanabilir, bunların gıda ve sağlık sektöründe kullanım olanakları incelenebilir.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2018a. Bioactive peptides database- University of Warmia and Mazury in Olsztyn, URL (Erişim tarihi: 27.11.2018) <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>.
- Anonim, 2018b. URL (Erişim tarihi: 27.11.2018) <https://prosite.expasy.org/scanprosite/> .
- Anonim, 2018c. The Universal Protein Knowledgebase, URL (Erişim tarihi: 10.10.2018) <https://www.uniprot.org/> .
- Aguilar, M.I., 2004. HPLC of Peptides and Proteins – Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, 251: 9-22.
- Agyei, D., Tsopmo, A., Udenigwe, C.C., 2018. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410: 3463-3472.
- Akpınar, A., Uysal, H.R., 2013. Gıda kaynaklı antihipertensif peptitlerin biyoyararlılığı, üretimi ve ilaç olarak kullanım olanakları. Gıda, 38(3): 167-174.
- Aloğlu, H.ř., Öner, Z., 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. Journal of Dairy Science, 94(11): 5305-5314.
- Arcan, I., Yemenicioğlu, A., 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. Food Chemistry, 103: 301–31.
- Bouhallab, S., Bougle, D., 2004. Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. Reproduction Nutrition Development, 44: 493-498.
- Cavazos, A., de Mejia, G.E., 2013. Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12: 364-380.
- Chobert, J.M., El Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarrrondo, M., Metro, F., Choiset, Y., Haertle, T., 2005. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine  $\beta$ -lactoglobulin and milk yoghurts obtained by using different starters. Lait. 85(3): 141-152.
- Christensen, J., E., Dudley, E., G., Pederson, J., A., & Steele, J., L., (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 76: (1-4), 217-246.
- Cicero, A.F.G., Gerocarni, B., Laghi, L., Borghi, C., 2011. Blood pressure lowering effect of lactotriptides assumed as functional foods: A meta-analysis of current available clinical trials. Journal of Human Hypertension, 25: 425-436.

- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M., 2012. Selected Lactic Acid Bacteria Synthesize Antioxidant Peptides During Sourdough Fermentation of Cereal Flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4): 1087-1096.
- Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., 2013. Antioxidant Activities of Buttermilk Proteins, Whey Proteins and Their Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 364-372.
- Dağlıoğlu, O., 2000. Tarhana as a Traditional Turkish Fermented Cereal Food, Its Recipe, Production and Composition. *Nahrung*, 44(2): 85-88.
- Delgado, M.C.O., Tironi, A.V., Anon, M.C., 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under stimulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology*, 44: 1752-1760.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17: 1321-1331.
- Dziuba, B., Dziuba, M., 2014. New Milk Protein-Derived Peptides with Potential Antimicrobial Activity: An Approach Based on Bioinformatic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 14531-14545.
- Elias R.J., Kellerby, S.S., Decker E.A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (5): 430-441.
- Fekete, A.A., Givens, D.I., Lovegrove, J.A., 2015. Casein-derived lactotripeptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials. *Nutrients*, 7: 659-681.
- Fukudome, S., Yoshikawa, M., 1992. Opioid Peptides Derived From Wheat Gluten: Their Isolation and Characterization. *FEBS Letters*, 296 (1): 107-111.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2010. Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Gıda*, 8:23-31.
- Hartman, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163-169.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3): 2260-2264.
- Herraiz, T., Casal, V., 1995. Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *Journal of Chromatography A*, 708: 209-221.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K., Starowicz, P., 2016. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Research International*, 85: 155-161.

- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Kim, D.S., Park, J.H., Lee, J.B., Kweon, D., Chung, G.Y., Seo, E.W., de Lumen, B.O., 2007. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 255: 42-48.
- Jin, Y., Yu, Y., Qi, Y., Wang, F., Yan, J., Zou, H., 2016. Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*, 141: 24-46.
- Jakala, P., Vapaatalo, H., 2010. Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals*, 3: 251-272.
- Kancabaş, A., Karakaya, S., 2012. Angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of boza, a traditional fermented beverage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 641-645.
- Kesler, Y., Doğan, M., Karaman, S., Kayacıer, A., 2008. Kan basıncını düşürücü süt kaynaklı peptitler. *Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum*.
- Kınık, Ö., Gürsoy, O., 2002. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2): 195-203.
- Koçak, A., Şanlı, T., 2016. Süt Proteini Kaynaklı ACE-İnhibitör Peptitleri: Oluşumu, Etki Mekanizması ve Biyoyararlılıkları. *Gıda*, 41 (4): 275-282.
- Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1: 177-187.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16:945-960.
- Kunda, P.B., Benavente, F., Catala-Clariana, S., Gimenez, E., Barbosa, J., 2012. Identification of bioactive peptides in a functional yogurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. *Journal of Chromatography A*, 1229: 121-128.
- Lafarge, T., O'Connor, P., Hayes., 2014. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis. *Peptides*, 59: 53-62.
- Lafiandre, D., Riccardi, G., Shewry, P.R., 2014. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. *Journal of Cereal Science*, 59: 312-326.
- Liepke, C., Zucht, H., Forssmann, W., Standker, L., 2001. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752(2): 369-377.
- Lollo, P.C.B., Amaya-Farfan, J., Faria, I.C., Salgado, J.V.V., Chacon-Mikahil, M.P.T., Cruz, A.G., Oliveira, C.A.F., Montagner, P.C., Arruda, M., 2014. Hydrolysed whey protein reduces muscle damage markers in Brazilian elite soccer players compared with whey

- protein and maltodextrin. A twelve-week in-championship intervention. *International Dairy Journal*, 34(1): 19-24.
- Lorenzen, P., Meisel, H., 2005. Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2): 119-124.
- Malkoski, M., Dashper, S.G., O'Brien-Simpson, N.M., Talbo, G.H., Macris, M., Cross, K.J., Reynolds, E.C., 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8): 2309-2315.
- Martin, M., Wellner, A., Ossowski, I., Henle, T., 2008. Identification and Quantification of Inhibitors for Angiotensin-Converting Enzyme in Hypoallergenic Infant Milk Formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6333-6338.
- Maux, S., Nongonierma, A.B., Murray, B., Kelly, P.M., FitzGerald, R.J., 2015. Identification of Short Peptide Sequences in the Nanofiltration permeate of a Bioactive Whey Protein Hydrolysate. *Food Research International*. 77: 534-539.
- Mejri, L., Vasquez-Villanueva, R., Hassouna, M., Marina, M.L., Garcia, M.C., 2017. Identification of peptides with antioxidant and antihypertensive capacities by RP-HPLC-Q-TOF-MS in dry fermented camel sausages inoculated with different starter cultures and ripening times. *Food Research International*, 100: 708-716.
- Mercier, A., Gauthier, S.F., Fliss, I., 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digest. *International Dairy Journal*, 14(3): 175-183.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., Darewicz, M., 2008. BIOPEP Database and Other Programs for Processing Bioactive Peptide Sequences. *Journal of AOAC International*, 91(4): 965-981.
- Morifuji, M., Koga, J., Kawanaka, K., Higuchi, M., 2009. Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides, Identified from Whey Protein Hydrolysates, Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 55: 81-86.
- Motoi, H., Kodama, T., 2003. Isolation and Characterization of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptides from Wheat Gliadin Hydrolysate. *Nahrung*, 47: 354-358
- Nakamura, T., Yoshida, A., Komatsuzaki, N., Kawasumi, T., Shima, J., 2007. Isolation and Characterization of a Low Molecular Weight Peptide Contained in Sourdough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4871-4876.
- Nogata, Y., Nagamine, T., Yanaka, M., Ohta, H., 2009. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Produced by Autolysis Reactions from Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 6618-6622.



- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2015. The scientific evidence for the role of the milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17: 640-656.
- Otağ, F.B., Hayta, M., 2013. Gıdalarda Biyoaktif Peptit Oluşumu ve Aktivitesi Üzerine Isıl İşlem ve un Etkileri. *Gıda*, 35(5): 307-314.
- Özdemir, N., Alkan, L.B., Çon, A.H., 2012. Taze ve depolanmış Kastamonu yaş tarhanasının mikrobiyolojik kalitesi. *Alinteri Journal of Agricultural Sciences*, 23(2): 35-40.
- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A., Malcata, F.X., Alichanidis, E., 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105(2): 647-656.
- Peng, X., Xiong, Y.L., Kong, B., 2009. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113: 196–201.
- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M.C., Adesso, S., Ostacolo, C., Marzocco, S., Novellino, E., Campiglia, P., 2016. Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 26: 494-505.
- Plaisancie, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., Boutrou, R., Paquet, A., Leonil, J., 2013. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 213-221.
- Pritchard, G.G., Coolbear, T., 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 179-206.
- Recio, I., Visser, S., 1999. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428(2-3): 314-326.
- Rizzello, C.G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2008. Synthesis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides and  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) during Sourdough Fermentation by Selected Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6936-6943.
- Ryhanen, E.L., Leppala, A.P., Pahlaka, E., 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11: 441-447.
- Sah, B.N., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O.N., 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156: 264-270.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O.N., 2015. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer:

- A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2): 123-138.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O.N., 2016. Antibacterial and antiproliferative peptides in synbiotic yogurt-Release and stability during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 99 (6): 1-10.
- 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.
- Szerszunowicz, I., Nalecz, D., 2018. The Use of UniProt/BIOPEP for the Analysis of Oat Globulin Physicochemical Parameters and Bioactivity. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(2): 119-125.
- Şanlıdere, H., Öner, Z., 2006. Süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve fonksiyonları. *Gıda*, 31(6): 311-317.
- Şanlıdere, H., 2010. Yoğurttan Biyoaktif Peptit Eldesi ve Bu Peptitlerin Antimikrobiyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 152s.
- Tamer, C.E., Kumral, A., Aşan, M., Şahin, İ., 2007. Chemical compositions of traditional Tarhana having different formulation. *Journal of Food Processing and Preservation*. 31: 116-126.
- Turpeinen, A.M., Jarvenpaa, S., Kautiainen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H., 2013. Antihypertensive effects of bioactive tripeptides – A random effects meta-analysis. *Annals of Medicine*, 45: 51-56.
- Wang, T., Hsieh, C., Hung, C., Jao, C., Lin, P., Hsieh, Y., Hsu, K., 2017. A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 234: 431-438.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111: 370–376.
- Xu, J., Qin, L., Wang, P., Li, W., Chang, C., 2008. Effect of milk tripeptides on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*, 24(10): 933-940.
- Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T., 1999. Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 82(7): 1388-1393.
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö., Akbulut, N., 2011. Süt kaynaklı biyoaktif peptitler ve fonksiyonel özellikleri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(1): 77-84.
- Yüksel, D., Arslan, S., 2016. Süt Proteinleri Kaynaklı Antimikrobiyal Peptitler. Türkiye 12. Gıda Kongresi (Bildiri/Poster) (Yayın No:3627221).

- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., Ma, B., 2012. PEAKS DB: *De novo* Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4).
- Zhao, C.J., Hu, Y., Schieber, A., Ganzle, M., 2013. Fate of ACE-inhibitory peptides during the bread-making process: Quantification of peptides in sourdough, bread crumb, steamed bread and soda crackers. *Journal of Cereal Science*, 57: 514-519.
- Zucht, H.D., Raida, M., Adermann, K., Magert, H.J., Forssmann, W.G., 1995. Casocidin-I: A casein- $\alpha_{s2}$  derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372: 185-188.



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı, soyadı : Doğanay YÜKSEL  
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti  
Doğum tarihi ve yeri : Ankara, 21.01.1986  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0536 978 41 79  
e-posta : dyuksel@ksu.edu.tr

### **Eğitim**

<b>Derece</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet tarihi</b>
Yüksek lisans	KSÜ, Gıda Müh. Böl.	--
Lisans	Pamukkale Üniversitesi, Gıda Müh. Böl.	2014
Lise	Samsun Anadolu Lisesi	2004

### **İş Deneyimi**

<b>Yıl</b>	<b>Yer</b>	<b>Görev</b>
2016-devam ediyor	KSÜ	Araştırma Görevlisi
2014-2016	Aktan Süt Ürünleri	Üretim Sorumlusu

### **Yabancı Dil**

İngilizce

### **Yayınlar**

Yüksel, D., İnanç, A.L., 2018. Investigation of Bioactive Peptides That are Released In Silico Digestion of Tarhana Proteins. III. International Energy & Engineering Congress (Özet Bildiri/Poster).

İnanç, A.L., Yüksel, D., 2018. Ihlamur Bitkisinin (*Tilia cordata*) Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Toplam Fenolik Madde Kinetiğinin Matematiksel Modellenmesi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 22 (1), 12-20. DOI: 10.29050/harranziraat.315709

Döndü, B., Küçüköğlü, M., Kurt, S., Yüksel, D., 2018. Kırmızı Biber Çekirdeğinin Fenolik Madde İçeriğinin ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması. Gıda Mühendisliği 9. Öğrenci Kongresi (Bildiri/Poster).

Yüksel, D., İnanç, A.L., 2018. Mathematical modeling of total polyphenol compound kinetics during solid–liquid extraction of linden (*Tilia cordata*) plant. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3619521).

İnanç, A.L., Yüksel, D., 2018. Isıl İşlemin Süt Kalitesine Etkisi. I. International Advanced Researches & Engineering Congress (Bildiri/Poster).

Yüksel, D., Arslan, S., 2016. Süt Proteinleri Kaynaklı Antimikrobiyal Peptitler. Türkiye 12. Gıda Kongresi (Bildiri/Poster) (Yayın No:3627221).

