T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT PROTEİNLERİNİN FARKLI ENZİMLERLE HİDROLİZASYONUSONUCU ÜRETİLEN PEPTİDLERİN TEKNOLOJİK ve FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Hatice BEKİROĞLU

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Ağustos, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT PROTEİNLERİNİN FARKLI ENZİMLERLE HİDROLİZASYONU SONUCU ÜRETİLEN PEPTİDLERİN TEKNOLOJİK ve FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Hatice BEKİROĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 29.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU, Üye
Kırklareli Üniversitesi _____

Dr. Öğretim Üyesi Fatih BOZKURT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğretim Üyesi Şefik TEKLE, Üye
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Süt Proteinlerinin Farklı Enzimlerle Hidrolizasyonu Sonucu Üretilen Peptidlerin Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hatice BEKİROĞLU

Anneme ve babama…

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süreci boyunca desteğini her zaman hissetiğim bilgi, öneri ve deneyimleriyle tezime katkı sağlayan danışmanım ve çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ ve eş danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a, tez çalışmam boyunca bilgi ve birikimlerinden yararlandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Başkanı ve hocalarına, tez çalışmam boyunca öneri ve deneyimleriyle beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Muhammet ARICI ve Sayın Prof. Dr. Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU'na, Tez Savunma Jüri üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şefik TEKLE'ye, tez çalışmamda özverili bir şekilde bana yardım eden değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatih BOZKURT, Dr. Abdulatef AHHMED, Dr. Kübra Feyza EROL, Arş. Gör. Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU'na ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürü borç biliyorum.

Ayrıca; hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hatice BEKİROĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ xii
TABLO LİSTESİ xiv
ÖZET xv
ABSTRACT xvii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 5
1.3 Hipotez 5
2 GENEL BİLGİLER 7
2.1 Süt 7
2.2 Süt Proteinleri 8
2.2.1 Kazein 11
2.2.2 Süt Serum Proteinleri 12
2.3 Protein Hidrolizi 13
2.3.1 Kimyasal Hidroliz 14
2.3.2 Mikrobiyal Fermentasyon 16
2.3.3 Enzimatik Hidroliz 18
2.4 Süt Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları 22
2.4.1 Beslenme 23
2.4.2 Biyoteknoloji Uygulamaları 23
2.4.3 Gıda Endüstrisi 23
2.4.4 Hayvan Yemi 24
2.4.5 Fermentasyon Endüstrisi 24
2.4.6 Kozmetik Endüstrisi 24
2.5 Hidrolizatların Teknolojik Özellikleri 24
2.5.1 Yağ Bağlama 28
2.5.2 Yüzey Hidrofobikliği 29
2.5.3 Jelleşme 30
2.5.4 Emülsiyon Özellikleri 31
2.5.5 Çözünürlük 34

2.5.6 Köpük Oluşturma 34
2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim 35
2.7 Protein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özellikleri 36
2.7.1 Antioksidan Kapasiteleri 36
2.7.2 Kardiyovasküler Hastalıklar 39
2.7.3 Antidiyabetik Aktivite 40
2.7.4 Antikanser 42
3 MATERYAL VE METOT 46
3.1 Materyal ve Kimyasallar 46
3.2 Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi 46
3.3 Hidroliz Derecesinin (%) Belirlenmesi 47
3.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid (SDS-PAGE) Jel Elektroforez Analizi 48
3.5 Yağ Bağlama Kapasitesi 49
3.6 Emülsiyon Aktivite ve Stabilite İndeksi 49
3.7 Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel) 50
3.8 Yüzey Hidrofobisitesi 51
3.9 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim 51
3.10 Antioksidan Aktivite 51
3.10.1 ABTS Yöntemi 52
3.10.2 FRAP Yöntemi 52
3.11 *In vitro* Antidiyabetik Aktivite 52
3.11.1 α-Glukozidaz İnhibitör Aktivitesi 53
3.11.2 α-Amilaz İnhibitör Aktivitesi 53
3.12 *In vitro* Sitotoksik Aktivite 54
3.13 İstatistiksel Analizler 55
4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA 56
4.1 Hidroliz Derecesi (%) 56
4.2 Protein ve Hidrolizatların Molekül Ağırlıklarının Değişimi (SDS-Page Analizi) 61
4.3 Protein ve Hidrolizatların Teknolojik Özelliklerinin Karakterizasyonu 64
4.3.1 Yağ bağlama kapasitesi 64
4.3.2 Emülsiyon Aktivite ve Stabilite İndeksi 67

4.3.3 Zeta Potansiyeli (Yüzey Yükü) 71
4.3.4 Yüzey Hidrofobisitesi 74
4.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim 77
4.5 Protein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özelliklerinin Karakterizasyonu 83
4.5.2 *In vitro* Antidiyabetik Aktivite 89
4.5.3 *In vitro* Sitotoksik Aktivite 93
5 SONUÇ 104
KAYNAKÇA 107
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 127

SİMGE LİSTESİ

a	Ağırlık
α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Fe	Demir
$FeCl_3.6H_2O$	Demir III klorür hekzahidrat
E	Enzim
g	Gram
h	Hacim
CO_2	Karbondioksit
kDa	Kilodalton
L	Litre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV	milivolt
M	Molarite
nm	Nanometre
N	Normalite
sa	Saat
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
W	Su
%	Yüzde
IC_{50}	%50 inhibitör konsantrasyonu

KISALTMA LİSTESİ

AA	Aminoasit
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACE	Angiotensin converting enzyme
AMP	Antimikrobiyal peptidler
ANS	1-anilino-8-naphthalene-sulfonate
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared
CaCas	Kalsiyum kazeinat
CaCo2	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
CAT	Katalaz
CO2	Karbondioksit
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeyici antioksidan güç
DH	Degree of Hydrolysis
DHA	Dehidro-alanin
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle's ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitrosalisilik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EAI	Emülsiyon aktivite indeksi
ESI	Emülsiyon stabilite indeksi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FRAP	Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilebilir
Gly	Glisin
Gln	Glutamin
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
HCl	Hidroklorik asit
HD	Hidroliz Derecesi
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen peroksit

LAB	Laktik asit bakterileri
LDL	Lipoprotein
Leu	Lösin
LPx	Laktoperoksidaz
MFGM	Süt yağı globül membran proteinleri
MIA PaCa2	İnsan pankreas kanser hücre hattı
MPC	Süt proteini konsantresi
MPH	Süt proteini hidrolizatı
MPI	Süt proteini izolatı
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NaCas	Sodyum kazeinat
NaOH	Sodyum Hidroksit
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
OPA	O-flaldialdehit
ORAC	Oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi
Örn	Örneğin
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phe	Fenilalanin
pI	İzoelektrik nokta
P-NPG	Para-nitrofenil-a-D-glukopiranozid
PO4	Fosfat
Pro	Prolin
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAA	Kükürt içeren amino asitler
Ser	Serin
SDS	Dodesil sülfat sodyum tuzu
SH	Sülfildril
SS	Disülfit
SSP	Süt serum proteini
S^0	Yüzey hidrofobikliği
SOD	Süperoksit dismutaz
TE	Troloks eşdeğeri
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
TEPGE	Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

Trp	Triptofan
vb.	ve benzeri
vd.	ve diğerleri
YBK	Yağ bağlama kapasitesi
WPC	Peynir altı suyu proteini konsantreleri
WPI	Peynir altı suyu proteini izolatları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Protein molekül zinciri, aminoasit, amino ve karboksil grubu **9**

Şekil 2.2 Enzimatik hidroliz akış şeması **20**

Şekil 2.3 Enzim-Substrat özgünlüğü ve enzimatik hidroliz mekanizması **21**

Şekil 2.4 Süt protein hidrolizatlarının kullanım alanları **22**

Şekil 2.5 Yüksek ve düşük enzim spesifikliğine sahip proteolitik enzimlerin ve emülsifiye edici özelliklere sahip peptid üretimine etkileri **33**

Şekil 4.1 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt protein örneğine ait zamana bağlı % HD değişimi **57**

Şekil 4.2 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein örneğine ait zamana bağlı % hidroliz derecesi değişimi **58**

Şekil 4.3 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP örneğine ait zamana bağlı % hidroliz derecesi değişimi **59**

Şekil 4.4 Süt proteini ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri **62**

Şekil 4.5 Kazein ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri **63**

Şekil 4.6 Süt serum proteini ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri **64**

Şekil 4.7 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait yağ bağlama kapasiteleri **65**

Şekil 4.10 SSP ve farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları **78**

Şekil 4.11 Kazein ve farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları **79**

Şekil 4.12 Süt proteini ve farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları **79**

Şekil 4.13 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki in vitro sitotoksik aktivitesi **93**

94

Şekil 4.14 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi. **94**

Şekil 4.15 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi. **95**

Şekil 4.16 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi. **96**

Şekil 4.17 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi. **97**

Şekil 4.18 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi. **98**

Şekil 4.19 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.....99**

Şekil 4.20 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.....100**

Şekil 4.21 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki in vitro sitotoksik aktivitesi**.....102**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Günlük diyette tüketilmesi gereken protein miktarı. **3**

Tablo 2.1 Temel Süt proteinleri **10**

Tablo 2.2 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı teknolojik özellikleri **26**

Tablo 2.3 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı fonksiyonel özellikleri **43**

Tablo 3.1 Enzimatik hidrolizde kullanılan enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerleri **47**

Tablo 4.1 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri **73**

Tablo 4.2 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait yüzey hidrofobisiteleri (S^o) **76**

Tablo 4.3 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının sekonder yapısındaki değişimler **81**

Tablo 4.4 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının antioksidan kapasiteleri **85**

Tablo 4.5 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının *in vitro* antidiyabetik aktivite kapasiteleri **90**

ÖZET

Süt Proteinlerinin Farklı Enzimlerle Hidrolizasyonu Sonucu Üretilen Peptidlerin Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Hatice BEKİROĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş-Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Bu çalışmada; süt proteinin farklı fraksiyonları olan kazein, serum proteini ve her ikisinden oluşan süt proteini farklı proteolitik aktiviteye sahip dört ticari enzim (alkalaz, savinaz, subtilisin ve flavourzyme) ile hidrolizi edilmiş ve elde edilen hidrolizatların bazı teknolojik ve fonksiyonel özellikleri karakterize edilmiştir. Kullanılan enzimlerin karakterlerine (endopeptidaz-ekzopeptidaz), bağlanma bölgelerine ve özellikle de enzim substrat özgünlüğüne göre hidroliz dereceleri (HD) önemli düzeyde farklılık göstermiştir. Bütün örneklerde savinaz en yüksek flavourzyme ise en düşük enzim aktivitesi göstermiştir. SDS-PAGE jel elektroforezi ile gözlemlenen molekül ağırlığındaki değişim, ilerleyen degradasyonla birlikte hidrolizatlarda üst bantların silinmesi ve yeni alt bantların oluşması ile şekillenmiştir. Yağ bağlama kapasitesi, emülsiyon stabilite ve aktivitesi gibi teknolojik özellikler hidrolizle geliştirilmesine karşın sınırlı hidrolizle daha etkili sonuçlar elde edilmiştir. Hidroliz işlemi ile modifiye edilen teknolojik karakterlerin özellikle hidroliz derecesine göre şekillendiği ve aşırı hidroliz prosesinin bazı teknolojik karakterlerde zayıflamaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Proteinlerin FTIR spektrumlarında özellikle de Amid I bölgesinde değişimlere sebep olan hidroliz, genel olarak proteinlerin sekonder yapılarından α-heliks tabakada azalmaya ve β-sheet tabakada artışa neden olmuştur. Biyoaktif özellikler bakımından hidroliz işleminin çok yönlü ve

uygulanabilir bir modifikasyon yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Bütün protein türleri için enzimatik hidroliz muamelesi çok daha güçlü bir antioksidan kapasitesi sağlamıştır. Antidiyabetik aktivitenin göstergesi olarak değerlendirilen α-amilaz ve α-glukozidaz enzim inhibisyonunda da hidrolizat örnekleri hidrolize olmayan fraksiyonlara göre çok daha güçlü bir etki sağlamış ve savinaz hidrolizatları bütün protein türlerinde en yüksek antidiyabetik aktiviteyi göstermiştir. Antidiyabetik aktiviteye benzer şekilde *in vitro* sitotoksik etki HD'nin artmasıyla daha da güçlenmiştir. MIA PaCa2 ve CaCo2 kanser hücre hatlarında en yüksek HD'ye sahip savinaz ve subtilisin hidrolizatları en düşük canlılık sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Kazein, enzimatik hidroliz, tekno-fonksiyonel özellikler, antioksidan ve antidiyabetik aktivite, sitotoksisite.

ABSTRACT

Determination of Technological and Functional Properties of Peptides Produced As A Result of Hydrolysis of Milk Proteins With Different Enzymes

Hatice BEKİROĞLU

Department of Food Engineering

Doctoral of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ

In this study; casein, whey consisting of different fractions of milk protein and milk protein were hydrolyzed with four commercial enzymes (alcalase, savinase, subtilisin and flavourzyme) with different proteolytic activities, and some technological and functional properties of the obtained hydrolysates were characterized. Hydrolysis degrees (DH) differed significantly according to the characters of the enzymes used (endopeptidase-exopeptidase), binding sites and especially enzyme substrate specificity. Savinase showed the highest enzyme activity and flavourzyme showed the lowest enzyme activity in all samples. The change in molecular weight observed by SDS-PAGE gel electrophoresis was shaped by the deletion of the upper bands and the formation of new lower bands in hydrolysates with progressive degradation. Although technological properties such as oil binding capacity, emulsion stability and activity were improved by hydrolysis, more effective results were obtained with limited hydrolysis. It was determined that the technological characters modified by the hydrolysis process are especially shaped according to the DH and that the excessive hydrolysis process causes weakening in some technological characters. Hydrolysis, which caused changes in the

FTIR spectra of the proteins, especially in the Amide I region, caused a decrease in the α-helix layer and an increase in the β-sheet layer. In terms of bioactive properties, it has been determined that hydrolysis is a versatile and applicable modification method. For all protein types, enzymatic hydrolysis treatment provided a much stronger antioxidant capacity. In inhibition of α-amylase and α-glucosidase enzymes, which are considered as indicators of antidiabetic activity, hydrolyzate samples provided a much stronger effect than non-hydrolyzed fractions, and savinase hydrolysates showed the highest antidiabetic activity in all protein types. Similar to the antidiabetic activity, the in vitro cytotoxic effect was further strengthened by increasing the DH. Savinase and subtilisin hydrolysates with the highest HD provided the lowest viability in MIA PaCa2 and CaCo2 cancer cell lines.

Keywords: Casein, enzymatic hydrolysis, techno-functional properties, antioxidant and antidiabetic activity, cytotoxicity.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Salgın hastalıklar, doğal afetler, savaşlar, yaşlılık, kronik ve akut hastalık gibi nedenlerden dolayı meydana gelen ölümlere karşın dünya nüfusundaki artış her geçen gün daha da hızlanarak devam etmektedir. İstatistiksel veriler ve tahminler dünya nüfusunu yıllık yaklaşık %1,07 oranında artışla 2030 yılına kadar 8,9 milyar olarak öngörürken, 2050 yılında ise bu sayının yaklaşık olarak 10 milyara kadar yükselebileceğini ifade etmektedir (Worldometers, 2023). Nüfustaki bu hızlı artış, insanlığın devamı için temel ihtiyaçlar listesinde ilk sırada yer alan beslenme ve gıda ihtiyacını da beraberinde getirmektedir. Nüfus artışı, küresel ısınma, tarım alanlarının azalması, kaynakların sınırlı olmasının yanısıra bu kaynakların verimsiz -yetersiz kullanımı da günümüz ve gelecekte gıda stoğundaki problemin en temel sebepleri olarak değerlendirilmektedir. Örneğin, 2010'dan 2050'ye kadar dünya et ve süt ürünleri tüketiminin sırasıyla yaklaşık %173 ve %158 artacağı öngörülmektedir (OECD/FAO, 2022). Gıda tüketiminin bu durdurulamayan genişlemesi, hayvansal proteine yönelik talebin artması, kıtlık, açlık, yetersiz beslenme gibi ciddi sonuçlar acil olarak çok daha gerçekçi çözüm önerileri geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Protein talebinin alternatif protein kaynaklarıyla karşılanmasının yanısıra mevcut protein kaynaklarının çok daha verimli, fonksiyonel kullanımına olanak sağlayan sistemlerin ve teknolojilerin geliştirilmesi de alınabilecek önlemler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda değerlendirildiğinde proteinler, temel gıda üretimi ve tüketiminin önemli bir kısmını oluşturmakta olup, özellikle hayvansal proteinlerin %92'si mevcut gıda uygulamalarında kullanılmaktadır.

Proteinler, vücutta çok sayıda yapısal ve fonksiyonel mekanizmada rol oynayan ve canlılığın devamı için gerekli diyet makrobesinler olarak tanımlanabilir. Aynı zamanda, protein ve protein bazlı bileşenler, formüle edilmiş birçok gıdada doku, renk, tat gibi birçok farklı teknolojik niteliğin kazandırılması ve diğer teknolojik özelliklere katkıda bulunarak ortaya çıkmasını sağlayan bileşenler olarak gıda uygulamalarında yer almaktaktadır (Loveday, 2019). Proteinler kaynaklarına, molekül yapılarına, yapılarında

bulunan kimyasal, biyolojik, fonksiyonel gruplara bağlı olarak ortaya çıkan beslenme özellikleri bakımından farklılık göstermektedir (Day vd., 2022).

Diyetimizdeki protein alımı, bütün gıdalardan (çiğ, pişmiş veya işlenmiş) veya hayvan veya bitkilerden elde edilen parçalanmış protein bileşenleri içeren formüle edilmiş gıda ürünlerinden sağlanmaktadır. Hayvansal proteinlerin, bitki bazlı proteinlere kıyasla çok daha yüksek besin kalitesine sahip olduğu bilinmektedir. Yüksek biyolojik değer olarak da ifade edilen bu besleyici nitelik proteinlerin amino asit bileşimine, sindirilebilirliğine, kalsiyum ve demir gibi diğer önemli besin maddelerini taşıma yeteneğine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca, gıdaya çekici dokusunu ve duyusal niteliklerini veren jelleşme, emülsifikasyon ve köpürme gibi teknolojik fonksiyonelliği bakımından da hayvansal proteinlerin bitki bazlı proteinlerden üstün olduğu ifade edilmektedir (Kim vd., 2020). Hayvansal kaynaklardan elde edilen proteinler, özellikle de süt proteinleri, bebekler başta olmak üzere bütün yaş gruplarındaki bireyler için bilişsel ve fiziksel gelişimleri yeterli ve dengeli ölçüde destekleyen en temel gıda maddesidir. Sürdürülebilirlik, yeni nesil proteinlerin keşfi, sağlık veya etik nedenler, ticari politikalar ve tüketim alışkanlıkları alternatif protein kaynaklarına olan talebi artırmış olsa da bilimsel yayın, rapor ve tavsiyelerin büyük kısmı hayvansal protein kaynaklarının gıda ve gıda takviye ürünlerinde kullanımını desteklemektedir (Day vd., 2022). Bazı bitkisel proteinler, hayvansal protein ürünlerine kıyasla farklı doku ve tat özelliklerine sahip olmasına karşın genel olarak dengesiz amino asit bileşimi (örn. Lizin gibi bazı esansiyel amino asitlerin eksikliği) ve moleküler yapılarından dolayı yavaş veya azaltılmış sindirilebilirlik göstermeleri nedeniyle daha düşük besin değerleri sunmaktadır (Day vd., 2022). Gıdalarla alınan proteinler, sindirim enzimleri tarafından küçük peptidlere ve amino asitlere kadar hidrolize edilerek vücut tarafından doku proteinlerinin sentezi (büyüme ve onarım) için emilir, enerji ihtiyaçlarını karşılamak için katabolize edilir veya hormonlar ve nörotransmitterler gibi nitrojen içeren diğer bileşikleri sentezlemek için kullanılmaktadır (Atherton vd., 2010). Günlük diyetten sağlanan enerjinin yaklaşık %80'ni proteinlerden karşılanmaktadır. Farklı cinsiyet ve yaş dağılımına sahip sağlıklı (%97-98) bireylerle gerçekleştirilen bir çalışma ile bir günlük diyette tüketilmesi gereken protein miktarı Tablo 1.1'de özetlenmiştir (Loveday, 2019).

Tablo 1.1 Günlük diyette tüketilmesi gereken protein miktarı (Loveday, 2019)

Tüketici grubu	Tahmini ortalama gereksinim (g/kg/gün)[a]	Önerilen diyet miktarı (g/ gün)[b]	Referans ağırlık (kg)
Bebek ve çocuklar			
2–6 ay	1,12[c]	9,1[d]	6
6–12 ay	1,0	11,0	9
1-3 yaş	0,87	13	12
4-8 yaş	0,76	19	20
Erkekler			
9–13 yaş	0,76	34	36
14-18 yaş	0,73	52	61
>18 yaş	0,66	56	70
Kadınlar			
9–13 yaş	0,76	34	37
14-18 yaş	0,71	46	54
>18 yaş	0,66	46	57
Gebelik	0,88	71	57
Emzirme	1,05	71	57

a: Günlük vücut ağırlığının kilogramı başına günlük gram protein.

B: Referans vücut ağırlıklarına göre günlük gram protein.

C: Dünya Sağlık Örgütü'nden alınmıştır (2007).

D: Anne sütü ile beslenen sağlıklı bebekler için ortalama alım, yeterli alım.

Süt, yenidoğanın beslenme ve fizyolojik bütün gereksinimlerini karşılayabilen yüksek kaliteli bir gıda maddesi olarak kabul edilmektedir (Roy vd., 2020). İnsanların tarih öncesi çağlardan beri beslenmelerinin önemli bir parçası olarak inek ve diğer (keçi ve koyun gibi) sütleri tükettiği bilinmektedir. FAO (2013)'e göre dünya çapında 6 milyardan fazla insan süt ve süt ürünleri tüketmektedir. İnek sütü ve ürünleri, küresel süt proteini tüketiminin çoğunu sağlarken, diğer hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünleri üretimi de dünya çapında istikrarlı bir şekilde artmaktadır (Roy vd., 2020). İnek sütü, yaygın

bulunabilirliği ve büyük üretim hacimleri nedeniyle dünya çapında en çok tüketilen süt çeşididir. Süt günümüzde en çok tüketilen içeceklerden biridir (Foroutan vd., 2019).

Süt, karbonhidrat (laktoz), lipitler, mineraller ve vitaminler gibi temel besinlerini içermesinin yanısıra günlük diyette sağladığı yaklaşık 32 g protein/L ile önemli bir enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir. Elde edildiği hayvan türüne bağlı olarak %3-7 oranında protein içeren süt, protein bakımından bir makrobesin kaynağı olarak kabul edilmektedir (Evershed vd., 2008; Dunne vd., 2012). Süt proteinleri yaklaşık %80 kazein ve %20 peynir altı suyu proteinleri olmak üzere iki gruba ayrılır. Başta αs-kazein (αs1 ve αs2), β-kazein ve κ-kazein olmak üzere kazeinler, inek sütündeki proteinlerin %78'ini oluşturmaktadır (Heck vd., 2009). Kazein süt proteinlerinin en önemli fraksiyonudur. Besin değerlerine ek olarak, süt proteinleri sütün çözünürlük, su bağlama, viskozite, emülsiyon ve ısı stabilitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinin şekillenmesinde rol almaktadır. Süt proteinleri ve fraksiyonları, sağlığı geliştiren fonksiyonel gıdalar için potansiyel bileşenler olarak kabul edilen aktif peptidlerin ana kaynaklarıdır (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri farklı proseslerle işlenerek değiştirilebilir; örneğin, az çözünür protein, çözünmeyen kollajenin çözünür jelatine dönüştürülmesinde olduğu gibi asit, alkali ve/veya ısı kaynaklı denatürasyon ve hidroliz yoluyla çözünebilir (Haug & Draget, 2011). Peynir altı suyu proteini gibi ısıya duyarlı proteinler, ısı stabilitesini iyileştirmek ve alerjeniteyi azaltmak için enzimatik olarak hidrolize edilebilir (Butré vd., 2012; Kankanamge vd., 2015). Farklı proteolitik enzim muameleri ile üretilen süt protein hidrolizatların transglutaminaz kullanılarak enzimatik polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma bulguları enzimatik hidrolizin, fonksiyonel duyusal özellikler bakımından çok daha nitelikli ve düşük immünoreaktiviteye sahip süt protein hidrolizat üretimine olanak sağladığını ortaya koymaktadır. Süt proteinlerinin enzimatik hidrolizatlarının fraksiyonlanması, hipoalerjenik preparasyonlar elde etmek için umut verici prosesler arasında yer almaktadır (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2021). Serum proteinleri ile yapılan bir çalışmada; β-LG hidrolizatları düşük ve yüksek moleküler boyutlu fraksiyonlara ayrılmış ve en düşük fraksiyonun (1000–5000 Da) en düşük antijeniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Emmett Grames, 2020; Svenning vd., 2000).

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında amaç; süt proteinin farklı fraksiyonları olan kazein, serum proteinleri ve ikisinin kompozisyonundan oluşan süt proteinlerinin farklı proteolitik aktiviteye sahip olan 4 farklı enzim ile hidrolize edilmesidir. Enzimatik hidroliz işleminde endopeptidaz ve/veya ekzopeptidaz karakterli olmak üzere farklı aktif gruplara sahip olan alkalaz, flavourzyme, savinaz ve subtilisin proteazları kullanılması planlanmıştır. Çalışmada ilk olarak, aynı protein fraksiyonunun proteolizinde farklı enzimlerin parçalanması dolayısıyla hidroliz derecesi üzerine olan etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Enzim-substrat ilişkisini daha detaylı olarak açıklayabilmek adına proteazların farklı süt protein fraksiyonlarında meydana getirdiği parçalanma derecesinin araştırılması amaçlanmıştır. İkinci olarak yüzey hidrofobisitesi, zeta potansiyeli, molekül ağırlıkları gibi bazı özellikleri analiz edilerek hidrolizatların fiziko-kimyasal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Enzimatik hidrolizin proteinlerin tekno-fonksiyonel karakterlerinde (yağ bağlama kapasitesi, emülsiyon aktivite-stablite indeksi) meydana getirdiği değişimin detaylandırılması amaçlanmıştır. Son olarak da enzimatik hidroliz muamelesinin parçalanma derecesi ve enzim türü gibi değişkenlere bağlı olarak hidrolizatların biyoaktif karakterlerinde (antidiyabetik, sitotoksik etki ve antioksidan kapasitesi) meydana getirdikleri değişimlerin detaylandırılması planlanmıştır.

1.3 Hipotez

Süt ve süt ürünleri dünya genelinde geniş bir tüketici talebini karşılayabilecek miktarda üretilen en önemli protein kaynakları arasında yer almaktadır. Dünyada yıllık çiğ süt üretimi yaklaşık 872 milyon tona ulaşarak bir önceki yıla kıyasla %1,3 oranında artış göstermiştir (TEPGE, 2021). Çoğu gelişmekte olan ülkelerde yaşayan yaklaşık 6 milyon insan süt ve süt ürünlerini tüketmektedir. 1960'ların başından bu yana, gelişmekte olan ülkelerde kişi başına süt tüketiminin neredeyse iki kat arttığı tespit edilmiştir. Kişi başına düşen süt tüketimi yöresel ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak değişim göstermekle birlikte, Avrupa ülkelerinde >150 kg/kişi/yıl, İran ve Orta Afrika'nın çoğu ülkesinde ise <30 kg/kişi/yıl olarak tespit edilmiştir (OECD/FAO, 2022). Kodeks Alimentarus, süt ürünlerini "sütün farklı proseslerle işlenmesiyle elde edilen, gıda katkı maddesi ve işleme için fonksiyonel olarak gerekli tüm bileşenleri içerebilen bir ürün" olarak tanımlamaktadır. Süt ürünleri yelpazesi, beslenme alışkanlıklarına, mevcut süt işleme teknolojilerine, pazar talebine ve sosya-kültürel koşullara bağlı olarak bölgeden bölgeye

önemli farklılıklar göstermektedir. Süt, yüksek kaliteli proteinlerin ve yağların önemli bir kaynağı olarak diyet enerjisinin karşılanmasında temel besin kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Süt proteinleri fonksiyonel gıda olarak kabul edilir ve büyümeyi, kemik sağlığını, kilo kontrolünü ve hatta kronik hastalıkları etkilediği bildirilmiştir. Günümüzde, sağlıklı bir metabolizma için protein tüketiminin öneminin daha çok vurgulanması, süt proteinlerinin farklı proseslerle çok daha fonksiyonel ve teknolojik karakterlere sahip hidrolizat üretimini gerekli kılmıştır (Jeong vd., 2022). Süt protein moleküllerinin içerisinde inaktif olarak bulunan biyoaktif peptidler, tüketimle birlikte sindirim enzimlerinin etkisiyle veya farklı hidroliz prosesleriyle aktif hale gelmektedir. Kazein ve serum protein hidrolizatları, yaşamsal öneme sahip vücut fonksiyonlarının gerçekleştirilebilmesinde ve sağlıklı halin devamlılığında etkin rol oynayan biyoaktif peptidlerce oldukça zengin kaynaklardır (Gür vd., 2010). Süt proteinleri ve bunların hidroliz ürünleri, yüksek düzeyde biyolojik aktivite ile karakterize edilmektedir. İnek sütü proteinlerinin, peptidlerinin ve amino asitlerinin sağlığı geliştirme potansiyeli, antioksidan, antienflamatuar ve immün sistemi uyarıcı özelliklerine olan etkisinden ileri gelmektedir. Süt proteinleri, peptidler ve enzimler, serbest radikalleri temizleyerek, metalleri şelatlayarak ve antioksidan enzimleri aktive ederek insan vücudunda prooksidan/antioksidan homeostazının korunmasında rol oynar. İnek sütünün önemli fraksiyonlardan biri olan laktoferrinin antikanserojenik potansiyeli çok yüksek olup özellikle metastatik meme kanseri, prostat kanseri, osteosarkom, akciğer kanseri ve gastrik adenokarsinoma hücre hatlarında önemli ölçüde sitotoksik etki sağladığı gözlemlenmiştir. Süt proteinleri, hidrolizatları ve peptidleri, bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücrelerini inhibe etme ve ortadan kaldırma yeteneğini artırarak sağlıklı halin devamlılığına katkı sağlamaktadır (Bielecka vd., 2022).

Sadece biyoaktif özelliklerince değil teknolojik karakterleri bakımından da süt proteinleri önemli kaynaklar olarak değerlendirilmektedir. Süt proteinleri birçok gıda uygulamasında, katkı maddesi, ana ve ara ürün olarak yer almanın yanısıra, ilaç, kozmetik, boya vb. birçok ürün prosesinde emülsifiyer, yağ su bağlama ajanı gibi birçok teknolojik karakterin kazandırılması ve güçlendirilmesinde kullanılmaktadırlar. Süt proteini bileşenlerinin kontrollü enzimatik hidrolizinin hidrolize olmayanlara kıyasla fonksiyonel özelliklerini değiştirdiği; enzim-substrat ilişkisine bağlı olarak artan hidroliz derecesinin (HD); çözünürlük, ısı stabilitesi, emülsifiye edici ve köpürme özelliklerine katkı sağladığı gösterilmiştir (Sinha vd., 2007; Ryan vd., 2023).

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Süt

Süt genellikle "mükemmel gıda" olarak adlandırılır. Doğum öncesi tüm dişi memelilerin meme bezlerinden üretilen süt, karbonhidratlar, proteinler, yağlar, mineraller ve vitaminler bakımından büyümekte olan yeni doğanların özel gelişimsel tüm ihtiyaçlarını karşılayan temel besin maddesidir (Albenzio vd., 2016; Murphy vd., 2017). İnek sütü makrobesin düzeyinde, tipik olarak su (%85−87), yağlar (%3,8−5,5), proteinler (%2,9−3,5) ve karbonhidratlardan (%5) oluşmaktadır. Mikro besinlerce çok zengin olan süt; vitaminler, mineraller, biyojenik aminler, organik asitler, nükleotitler, oligosakkaritler ve immünoglobulinler gibi birçok biyoaktif bileşik içermektedir (Foroutan vd., 2019). Sığır sütü en besleyici gıdalardan biridir ve insan tüketimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Vücudumuzdaki biyokimyasal süreçleri etkileyen, belirli organların gelişimini ve işleyişini etkileyen ve hastalıklardan korunma sağlayan çeşitli biyolojik özelliklere sahip zengin besin kaynaklarından biridir. Süt, düzenli tüketimde patojenlere ve hastalıklara karşı koruma sağlayan biyoaktif proteinler ve peptidler, oligosakkaritler, immünoglobülinler ve yağlar/lipidler gibi çok çeşitli biyolojik olarak aktif bileşenler içermektedir. Süt, inek, manda, keçi ve koyun dahil olmak üzere birçok sağmal hayvandan elde edilebilir. İnek sütü, büyüme ve gelişmeyi destekleyen yaklaşık %3,5 toplam protein, yağ ve gerekli vitaminleri içermektedir (Yalçın, 2006). Çeşitli biyolojik özellikler gösteren, doğal ve zengin içerikli iyi dengelenmiş bir besin kaynağıdır. Bebek gelişimini destekleyen, büyümeyi uyaran, kas kütlesini iyileştiren ve temel beslenmenin ötesinde olumlu sağlık etkileri sağlayan sütün bu özellikleri, süt proteinlerinin/peptidlerinin varlığından kaynaklanmaktadır (Minj & Anand, 2020). Ayrıca, sütten ekstrakte edilen proteinler çoklu fonksiyonel özellikleri ile karakterize edilirler ve gıda uygulamalarında çeşitli endüstriler tarafından kullanılmaktadır. Süt proteini sistemi ağırlıklı olarak iki tür proteinden oluşur. Bunlar; genellikle yağsız sütten asit (izoelektrik çökeltme) veya enzimler (rennet pıhtılaşması) kullanılarak çökeltme yoluyla elde edilen yaklaşık %80 (a/a) kazein ve kazein çıkarıldıktan sonra geriye kalan bir yan ürün olan %20 peynir altı suyudur.

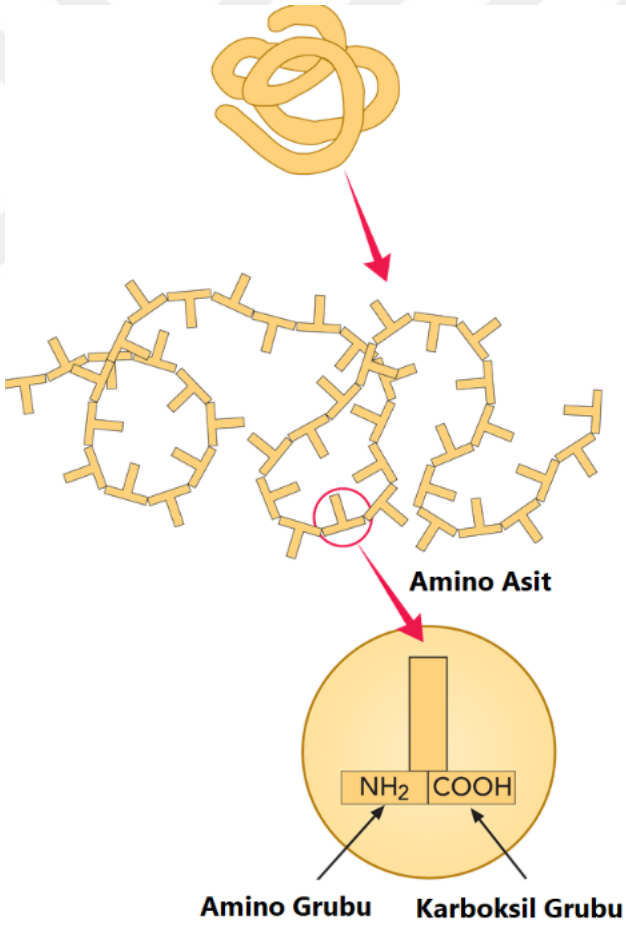
2.2 Süt Proteinleri

Proteinler, esansiyel amino asitler ve biyoaktif peptidler sağlamaları, metalleri ve vitaminleri bağlamaları ve taşımaları, antikorlar ve hormonların düzenlenmesi gibi belirli işlevleri yerine getirmeleri nedeniyle çeşitli metabolik işlevler için önemli makrobesinleridir (Borad vd., 2017). Proteinler, gıda kalitesini, stabilitesini ve tekno-fonksiyonel özellikleri belirleyen besin bileşenleri olarak üretim proseslerinde yer almaktadır. Çok yönlü yapıları ve kimyasal bileşimleri göz önüne alındığında, proteinlerin amfifilik (hem hidrofilik ve hidrofobik özellikler taşıyan) ve kendileriyle ve diğer moleküllerle etkileşime girebilen karakterinde olduğu anlaşılmaktadır (Higuera-Barraza vd., 2016). Süt ve süt ürünleri insanlar için en önemli protein kaynakları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, süt proteinleri içeren bir gıda ürününün işlenmesi sırasındaki zorunlu ısıl işlemler, yapılarında değişikliklere neden olarak proteinin açılmasına, hidrofobik grup oluşumuna, agregasyona ve/veya topaklaşmaya neden olabilir. Tüm bu modifikasyonların teknolojik özellikleri ve dolayısıyla gıda dokusu üzerinde istenen veya istenmeyen etkileri olabilmektedir (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). Yüksek kaliteli gıda ürünlerine yönelik artan tüketici talebi nedeniyle, gıda ürünlerini korumayı ve kalite, güvenlik ve yüksek beslenme özelliklerini minimum düzeyde işleme ve minimum düzeyde veya hiç kimyasal koruyucu madde eklemeden sağlamayı amaçlayan teknikler geliştirilmesine yönelik önemli çalışmalar yapılmaktadır (Borad vd., 2017). Bu bağlamda, ultrason, yüksek basınçlı işlem, vurgulu elektrik alanları, mikrodalga, radyo frekansı ve ışınlama gibi yenilikçi teknolojiler, gıda ürünlerinin biyolojik ve duyusal özelliklerini optimize etmek, muhafazalarını garanti altına almak ve ikincil etkileri en aza indirmek için geliştirilmiştir.

Süt proteinleri temel olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; pH 4,6'da çözünmeyen ve inek sütünün toplam protein içeriğinin %80'ini temsil eden kazeinler ve yaklaşık pI değeri 5,0 olan ve toplam proteinin diğer %20'sini temsil eden peynir altı suyu proteinleridir (Tablo 2.1). Süt proteinlerinin teorik sınıflandırmasına rağmen, bu proteinler tipik olarak gıda ürünlerine toz halinde ticari bileşenler olarak, popüler olarak süt proteini veya fraksiyonlarının konsantreleri veya izolatları olarak dahil edilir. Süt proteini konsantresi (MPC) genellikle yaklaşık %40-85'lik bir toplam protein konsantrasyonu sunarken süt proteini izolatı (MPI) %90'dan fazla protein içeriğine sahiptir (Agarwal vd., 2015). Bu ürünlerde yaklaşık %80 kazein ve %20 peynir altı suyu proteini oranı korunmaktadır. Kazein fraksiyonundan izole edilmiş kazein misellerinden,

kalsiyum kazeinat (CaCas) ve sodyum kazeinat (NaCas) elde edilebilmekte olup, bunlar arasında daha iyi çözünürlüğü nedeniyle NaCas en çok kullanılanıdır (Silva, Ahrné, Ipsen ve Hougaard, 2018). Peynir altı suyundan ise toplam protein içeriği tipik olarak %30-%80 arasında olan peynir altı suyu proteini konsantreleri (WPC) ve toplam protein içeriği %90 olan peynir altı suyu proteini izolatları (WPI) üretilebilmektedir.

Süt proteinlerinin geniş bir endüstriyel kullanıma sahip olması, benzersiz işlevlerine ve besleyici değerlerine dayanmaktadır. Süt proteini fraksiyonunun çeşitliliği, çok sayıda proteinaz ve kullanılan kontrollü hidroliz koşulları, çeşitli amaçlar için uygun hidrolizatların hazırlanmasına neden olmuştur. Süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi, kullanılan enzimlere ve hidroliz koşullarına bağlı olarak hidrolizatların tekno-fonksiyonel ve biyofonksiyonel özelliklerini değiştirir. Süt proteini hidrolizatları (MPH) normal ve klinik beslenmede ve fonksiyonel gıda bileşeni olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1 Protein molekül zinciri, aminoasit, amino ve karboksil grubu (The Chemistry Of Milk | Dairy Processing Handbook - tetrapak.com)

Tablo 2.1 Temel Süt proteinleri (Livney, 2010)

		Sütteki miktarı (g/L)	Molekül Ağırlığı (kDa)
Kazein		24–28	
	αs1 (αs1-CN)	12–15	22,1–23,7
	α s2(αs2-CN)	3–4	25,2–25,4
	β (β-CN)	9–11	23,9–24,1
	κ (κ-CN)	3–4	19,0
Serum proteinleri		5–7	
	β-laktoglobulin (β-lg)	2–4	18,3
	α-laktalbumin (α-la)	1–1,5	14,2
	Sığır Serum albumini (BSA)	0,1–0,4	66
	Immunoglobulin (Ig)	0,6–1,0	146–1030
	Laktoferrin (Lf)	~ 0,1	
Süt yağı globül membran (MFGM) proteinleri		~ 0,4	13–200

2.2.1 Kazein

Kazein, sığır sütündeki toplam protein içeriğinin %80'ini oluşturan bir fosfoprotein karışımıdır (Phadungath, 2005). Kazein hem hidrofobik hem de hidrofilik alanlara sahip polipeptid miselleri formunda bulunan süt proteinlerinin hayati bir parçası olan ana fosfoproteinlerdir. Kazein, pH 4,6'da proteolitik pıhtılaşma veya izoelektrik çökeltme ile üretilebilen, açık yapısı nedeniyle yüksek yüzey hidrofobikliğine sahip, oldukça esnek ve yapılandırılmamış bir proteindir (Huppertz vd., 2018). Aynı zamanda, birçok gıda uygulamasında moleküler düzeyde karışık protein sistemlerinin emülsifiye edici ve stabilite mekanizmalarını sağlamaktadır. Süt proteinlerinin iyi korunmuş kazein dizileri, protein katlanması olmadan kazein moleküllerinin kendi kendine birleşmesine yol açan ikincil yapısından kaynaklanmaktadır. Başka bir deyişle, kazeinde üçüncül yapı neredeyse yoktur ve ikincilden kuaterner yapıya doğrudan sert ve esnek bir kazein yapısı oluşur (Farrell vd., 2006). Moleküler ağırlıkları 19 ile 25 kDa arasında olan kazein fraksiyonları, protein zinciri boyunca farklı hidrofobik ve hidrofilik bölgelere sahiptir. Dört alt birimden oluşan kazein yapıları; tüm kazeinin yaklaşık %38'ni oluşturan αS1-kazeinden, %10'u αS2-kazeindenden, %36'sı β–kazeinden ve %12'si ise ve κ-kazeinden meydana gelmektedir (Wusigale vd., 2020). αS1- ve αS2-kazeinler, uzun sarmal benzeri konformasyona sahip doğal olarak katlanmamış proteinler olmasına karşın β- ve κ-kazeinler, yüksek derecede hidrasyon ve yan zincir esnekliği ile kompakt bir yapıya sahip erimiş globül benzeri proteinlere sahiptir (McMahon & Oommen, 2011). Tüm kazeinler, N-terminalinde sinyal peptidlerine ve C-terminaline yakın potansiyel bir amorf kalsiyum fosfat bağlama motifi oluşturan Pro-Gln bakımından zengin sekanslara sahiptir (Holt vd., 2013). Bu nedenle α-kazein 8-10 seril fosfat grubundan (PO_4 kalıntıları) oluşurken, β-kazein 5 fosfoserin kalıntısından oluşur ve diğer kazeinlerden çok daha hidrofobik karakterlidir (Phadungath, 2005). κ-kazein, bir fosfoserin grubuna sahip tek glikosile edilmiş kazein olup esas olarak galaktoz, galaktozamin ve N-asetilnöraminik asit içermektedir. κ-kazein, kalsiyum iyonlarının varlığında kararlı halde olduğu için diğer kazeinleri çökmeden korur ve kazein misellerini stabilize ederek pıhtılaşma mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Sütteki kazeinin yaklaşık %95'i, yüksek oranda kalsiyum veya inorganik fosfat içeren misel olarak bilinen büyük agreat kolloidleri formunda bulunmaktadır. Kazein miselleri, 2–3 g H_2O/g protein (tipik hidrasyon) değerleri ile açık ve oldukça hidratlı bir yapıya sahiptir (Horne, 2020). Kazeinat, kazeine alkali ilave edilerek elde edilebilmektedir. Kazein yüksek pH

değerlerinde çözülebildiğinden, alkalize edici maddenin katyonuna bağlı olarak farklı kazeinat türleri üretilebilmekte ve sonuçta sodyum, kalsiyum, potasyum ve amonyum kazeinatlar gibi farklı kazeinat türleri elde edilebilmektedir. Sütteki kazeinin yaklaşık %95'i, yüksek oranda kalsiyum veya inorganik fosfat içeren, misel olarak bilinen büyük toplu kolloidler formunda bulunur (McMahon & Oommen, 2013). Kazeinat, kazeine alkali ilave edilerek elde edilebilir. Kazein pH yükseltilerek çözülebildiği gibi, alkalize edici maddenin katyonuna bağlı olarak farklı türde kazeinatlar üretilerek sodyum, kalsiyum, potasyum ve amonyum kazeinatlar elde edilebilir (El-Bakry, 2011).

2.2.2 Süt Serum Proteinleri

Peynir altı suyu, peynir serumu olarak da adlandırılan sütün sarı-yeşil renkli sıvı kısmıdır ve pıhtının ayrılmasından sonra, sütün proteolitik enzimler veya asitler kullanılarak pıhtılaştırılmasıyla elde edilir. Peynir altı suyu veya serum proteinleri, toplam süt proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan çözünebilir süt proteinleridir. Peynir altı suyu proteini, temel olarak β-laktoglobulin (18,4 kDa) ve α-laktalbümin (14,2 kDa) den oluşurken az miktarlarda da laktoferrin, immünoglobulinler, serum albümin, gliko makropeptid, enzimler ve büyüme faktörleri içermektedir (McGregor & Poppitt, 2013). β-laktoglobulin peynir altı suyu proteininin yaklaşık %58'ini oluştururken ve ikinci en çok bulunan bileşen α-laktalbümindir (%13) (Kilara & Vaghela, 2018). β-laktoglobulin, 7 ana β-kıvrımlı tabaka şeridinden ve küçük bir α-sarmalından oluşan küresel bir yapıya sahiptir. Proteinlerin ikincil ve üçüncül yapıları ısıya veya diğer çevresel değişikliklere maruz kaldığında, sülfidril bileşenleri birbirleriyle reaksiyona girerek disülfid değişimi ve çapraz bağlanma reaksiyonlarına neden olabilmektedirler (Boland, 2011). Peynir altı suyunda en yaygın ikinci protein olan α-laktalbümin, dört disülfit bağı olan ve fosfat grubu içermeyen 123 aminoasit içermektedir. α-laktalbumin, laktoz (süt şekeri) sentez enziminin bir parçasını oluşturduğu için birçok memelinin sütünde yaygın olarak bulunmaktadır. α-laktalbüminin yapısı, disülfit köprüsü tarafından stabilize edildiği için çevresel koşullarına bağlı olarak kendi kendine açılıp yeniden katlanabileceği özelliğine sahiptir (Boland, 2011).

Doğası gereği asidik olan peynir altı suyunun doğrudan asitleştirme yoluyla üretilmesiyle pH değeri yaklaşık 5,1 olmasına karşın, özellikle peynir yapım sürecinde peynir mayası pıhtılaşması yoluyla üretilen tatlı peynir altı suyunun pH değeri yaklaşık 5,6 olmaktadır. Yüksek biyolojik oksijen talebi ve yüksek organik madde sorunları nedeniyle onlarca

yıldır büyük bir süt atığı olarak kabul edilmektedir (Ahn vd., 2005). Genel olarak peynir yapımından elde edilen taze sıvı peynir altı suyunun %94,2'si su ve %5'i toplam katı maddelerden oluşmaktadır. Peynir altı suyunun bileşimi ve özellikleri, hayvanın diyetine, üretildiği süte, kullanılan işleme tekniklerine ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak; %0,8 peynir altı suyu proteinlerinden, %0,5 minerallerden, %0,1 yağ ve %4,3 ana madde olan laktozdan oluşmaktadır (Almeida vd., 2013). Peynir altı suyu proteinleri, polipeptid zincirleri boyunca eşit olarak dağılmış hidrofilik ve hidrofobik ve ayrıca asidik ve bazik amino asitlere sahip önemli sayıda alfa-sarmalları içeren küresel proteinlerin bir formudur (Minj & Anand, 2020). Bununla birlikte, günümüzde peynir altı suyu proteinleri potansiyel bir besin kaynağı olarak tanınmakta ve biyoaktif bileşenleri, yüksek besin içeriği ve benzersiz tekno-fonksiyonel işlevleri nedeniyle, süt endüstrisi ile birçok ticari gıda ürünü uygulamasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Minj & Anand, 2020). Geniş bir pH aralığında çözünürlük gösterebilmesi, esansiyel amino asitlerce zengin besin profilinde olması, birçok tekno-fonksiyonel karakterin oluşumuna katkı sağlayan fonksiyonelliği ve nispeten düşük maliyetli olması gibi benzersiz özellikleri, peynir altı suyu proteinlerini çok çeşitli gıda ürünlerinin formüle edilmesinde ideal bir bileşen haline getirmektedir. Peynir altı suyu tozu, peynir altı suyu proteini konsantreleri ve peynir altı suyu protein izolatları şeklinde bulunur ve esas olarak peynir altı suyundan (peynir endüstrisinin bir yan ürünü) üretilmektedirler. Globüler proteinler, hidrofilik bölgelerin dışa doğru bulunduğu küresel bir yapıya sahiptir. Bu küresel yapıda çözücülerle dipol-dipol etkileşimlerin sağlanabilmesi için hidrofobik bölgeler içe doğru gömülü olarak bulunmaktadır. Globüler proteinler fiziksel, kimyasal ve yapısal özellikleri etkileyebilecek tersiyer yapıdaki değişikliklere ve denatürasyon derecesine bağlı olarak çeşitli işlevlere sahiptir (Alting & van de Velde, 2012).

2.3 Protein Hidrolizi

Hidroliz protein substratından amino asitlerin serbest bırakılması ve bunların hidrolizat içinde kantitatif olarak geri kazanılması olarak tanımlanabilmektedir. Çok sayıda faktör nedeniyle (sıcaklık, zaman, hidroliz maddesi, katkı maddeleri gibi) bu parçalanma işlemini tam olarak yerine getirebilecek bir hidroliz yöntemi bulunmamaktadır. Hidroliz prosesi; kimyasal hidroliz, proteolitik karakterli mikroorganizmalarla (maya, küf, bakteri) gerçekleştirilen mikrobiyal fermentasyon ve yine proteolitik karakterli enzimlerce

gerçekleştirilen enzimatik hidroliz olmak üzere 3 ana metotla gerçekleştirilebilmektedir. Farklı hidroliz muameleleri farklı karakteristiğe sahip hidrolizat eldesinin yanısıra, farklı sekonder metabolitlerin de ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Hidroliz tekniğine göre biyoaktif karakterler ya da tekno-fonksiyonel özellikler üzerine önemli modifikasyonlar uygulanabilmektedir.

2.3.1 Kimyasal Hidroliz

Kimyasal hidroliz, asidik veya bazik koşullar altında gerçekleştirilebilir.

2.3.1.1 Asidik Hidroliz

Asidik hidroliz, proteinlerdeki peptid bağını parçalamak için kullanılan en önemli tekniktir. Proteinlerin asit hidrolizine ilişkin ilk deneyler, 1820'de Henri Braconnot tarafından jelatin, yün ve kas liflerinin konsantre sülfürik asitle hidrolize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 60 yılı aşkın bir süre önce geliştirilmiş olmasına rağmen, 110 °C'de 24 sa. süre ile gerçekleştirilen 6 M HCl (hidroklorik asit) asit hidrolizi, halen en yaygın kullanılan asidik hidroliz tekniğidir (Fountoulakis & Lahm, 1998). Bunun nedeni hem sıvı hem de gaz fazında kullanılabilmesi ve daha sonra buharlaştırılabilmesidir. Böylece hidrolizat küçük bir sulandırma tamponu hacminde geri kazanılabilerek reaktif için uygulama kolaylığı sağlanabilmektedir. Analizin az miktarda substrat ile gerçekleştirilebilmesi sınırlı miktarlarda protein numunesi mevcut olan analizler için yöntemi kullanışlı kılan diğer bir avantajdır. Analiz, az miktarda substrat ile gerçekleştirilebilmektedir. Son on yılda, amino asit geri kazanım verimini artırmak için çeşitli hidroliz ajanlarının kullanıldığı, hidroliz süresi ve sıcaklığının değiştirildiği amino asit analizi ile ilgili proteinlerin asidik hidrolizi hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Şimdiye kadar hiçbir hidroliz yöntemiyle bir protein substratındaki tüm amino asitlerin tamamen serbest bırakılması ve onları %100 verimle geri kazanılması mümkün olmamıştır (Mustăţea vd., 2019). Asidik analiz yöntemlerinin çoğu, vakum altında genel olarak, 6M hidroklorik asit kullanılarak ve 100- 160°C sıcaklık ve 18 ile 72 sa. süre aralığında gerçekleştirilmiştir. Asidik hidrolizde, uzun hidroliz süreleri, düşük verimler ve bazı amino asitlerin kararsızlığı gibi problemler yöntemin zayıf taraflarıdır. Amino asitler kimyasal olarak çeşitli bileşikler grubudur ve asit hidrolizi sırasında bunlardan sadece birkaçı (aspartik asit, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, lösin, fenilalanin, histidin ve arginin) kantitatif olarak belirlenebilir. Diğer amino asitler hidroliz sırasında transformasyona uğrayabilir. Asparajin ve glutamin, asit hidrolizi sırasında aspartik asit

ve glutamik aside dönüştürülerek deaminasyon reaksiyonlarına maruz kalır. Yine serin ve treonin de asit hidrolizi sırasında kısmen yok edilen iki amino asittir, bu aminoasitler için asidik hidrolizde önemli kayıplar olduğu bildirilmiştir. Valin, izolösin yüksek miktarda hidrofobik tortulara peptid bağları içerdiği için asitle parçalanması oldukça zordur. Asidik hidroliz işleminde kantitatif verimi artırmak için 24 saatten daha az hidroliz, çoklu hidroliz süreleri ve hidrolitik kayıpları düzeltmek için düzeltme faktörlerinin geliştirilmesi gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır (Mustăţea vd., 2019).

2.3.1.2 Alkali Hidroliz

Proteinleri hidrolize etmek için başlıca sodyum hidroksit olmak üzere çeşitli alkali reaktantlar kullanılmaktadır. Hidroliz için alkali kullanımı genellikle zayıf fonksiyonelliğe neden olmakta ve daha da önemlisi hidrolizatın besleyici değerini olumsuz etkileyebilmektedir. Buna rağmen, gıda endüstrisinde proteinlerin geri kazanılması ve çözündürülmesi için sınırlı düzeyde alkali muamelesi kullanılmaktadır (Kristinsson & Rasco, 2000). Örneğin, mekanik olarak kemiği ayrılmış hindi artığı, alkali muamelesi ile geri kazanılabilen ve gıda uygulamalarında kullanılabilen önemli oranda alkalide çözünür protein içermektedir. Alkali hidrolizin kullanımını sınırlandıran en temel problemlerden biri hidroliz sırasında alkali çözeltilerde zararlı bileşenlerin oluşumunu tetikleyen reaksiyonların meydana gelmesidir. Örneğin, bir amino asidin alfa karbonundan hidrojenin çıkarılmasıyla başlayan reaksiyonlar zincirinde insanlar tarafından emilmeyen D-amino asitleri üreten L-amino asitlerin rasemizasyonu gerçekleşmektedir. Ayrıca β-eliminasyon reaksiyonları ile sistein, serin ve treonin kaybı ile disülfid bağları parçalanır ve lizinoalanin, ornitinoalanin, lantionin ve β-amino alanin oluşumları da meydana gelebilmektedir (Kinsella, 1979). Bu eliminasyon ve eklemelerin bazıları gıdalarda son derece istenmeyen toksik maddelerin oluşumuna yol açabilmektedir. Alkali hidroliz reaksiyon ürünleri, proteolitik enzimler üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir ve hidroliz oranını azaltıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Alkali hidroliz muameleleri süt endüstrisinde nadiren kullanılmaktadır. Alkali ile işlenmiş süt proteinin farklı kimyasal değişikliklere uğradığı, insanlarda emilimi çok az olan D-amino asitlerinin oluşması ile protein kalitesinin düştüğü bildirilmiştir. Alkali muamele, lizino-alanin, lantionin gibi amino asitler arasında çapraz bağ oluşumu ve enzim bağlanma bölgelerinin kaybına neden olduğu için protein sindirilebilirliğinin önemli ölçüde azaltmaktadır (Borad vd., 2017). Henderson & Snell (1948) kazeinin baryum hidroksit ile hidrolizinde arginin ve treoninin tamamen, valin, histidin ve izolösinin kısmen yok

edildiğini ve oluşan D-serinin nefrotoksik olduğu bildirilmiştir (Ganote vd., 1974). Rasemizasyon, süt proteinlerinin alkali hidrolizatlarını içeren ürünlerde sağlık üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Alkali prosesler, sistein ve serin kalıntılarından dehidro-alanin (DHA) kalıntılarının oluşmasına neden olmaktadır. Oluşan DHA lisinin ϵ-amino grubuyla veya bozulmamış sistin kalıntısıyla reaksiyona girerek süt proteinlerinin besleyici değerini azaltabilmektedir. Alkali muamelesinin koşullarına (süre, sıcaklık, pH) bağlı olarak protein kalitesindeki kayıplar proteinin biyolojik değerini tamamen düşürebilecek düzeyde gerçekleşebilmektedir. Örneğin, 0,2 M NaOH (40°C, 4 sa.) ile hidroliz edildiğinde kazeinin nitrojen sindirilebilirliğinin %19 oranında azaldığı, alkali konsantrasyonu 0,5 M'ye (40°C, 4 sa.) yükseltildiğinde ise sindirilebilirliğin %43'e düştüğü bildirilmiştir (Borad vd., 2017). Dakin & Dudley, (1913), alkali ile muamele edilmiş kazeinin köpeklere verildiğinde tripsin veya pepsin tarafından hidrolize edilmediğini ve bunların dışkıda olduğu gibi atıldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, alkali ile muamele edilmiş kazein hidrolizatları farelere (Ramasarma vd., 1949) ve tavuklara (Carpenter & Duckworth, 1950) verildiğinde toksik etkiler meydana getirdiği kanıtlanmıştır.

2.3.2 Mikrobiyal Fermentasyon

Mikrobiyal fermentasyon, biyoaktif peptidlerin eldesinde kullanılan biyoteknolojik bir süreçtir. Bu süreç, proteolitik enzimler üretebilen mikroorganizmaların, bu enzimlerin proteinleri daha kısa peptidlere hidrolize etmesi amacıyla kullanılması olarak tanımlanmaktadır (Onuh vd., 2014). Genel olarak kullanılan mikroorganizmalar, substratta yerel olarak bulunabilen veya bir starter kültür olarak eklenebilen bakteri, mantar veya mayalardan oluşmaktadır. Mikrobiyal fermentasyon süreci birkaç sistemden oluşmaktadır. Bununla birlikte, batık fermentasyon ve katı hal fermentasyonu en yaygın kullanılan mikrobiyal fermentasyon yöntemleridir. Batık fermentasyon, sıvı bir besiyeri ortamda bulunan mikroorganizma kültürünü ifade etmektedir. Bu sistem, bakteriler gibi yüksek su seviyesi aktivitelerine sahip mikroorganizmalar için oldukça uygun bir besiyeri ortamı olarak kabul edilir. Bu sistem üretilen biyoaktif peptidlerin saflaştırılmasının kolaylaştırması gibi proses avantajları sunmaktadır. Mikrobiyal besin açısından zengin bir katı besiyeri yüzeyi sağlayan katı faz fermentasyonu, besin maddelerini kontrollü bir şekilde salma avantajına sahip olduğu için daha az nem gereksinimi olan mantarlar ve diğer mikroorganizmalar için uygundur. Mikrobiyal fermentasyon işlemi sırasında, daha yüksek biyoaktiviteye ve teknolojik özelliklere sahip peptidler üretmek için uygun

substrat, mikroorganizma, pH, sıcaklık ve nem gibi optimum çevresel koşulların sağlanması çok önemlidir. Ürettikleri proteolitik sistemler benzersiz olduğundan, mikrobiyal fermentasyon her mikroorganizma türü (bakteri, mantar veya maya) ve substrat için farklılık göstermektedir. Laktik asit bakterileri (LAB), hayvan ve bitki substratları gibi farklı ortamlara yüksek uyum sağlama yetenekleri nedeniyle mikrobiyal hidrolizde en değerli mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Bazı LAB suşları ise onları karakterize eden verimli proteolitik sistem nedeniyle "genel olarak güvenli (GRAS)" olarak tanımlanan dost bakteriler olarak bilinmektedir. Mikrobiyal fermentasyon için sıklıkla tercih edilen LAB'lardan bazıları *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus, Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis, Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Streptococcus thermophilus* olarak sıralanabilmektedir (Hernández-Ledesma vd., 2011). Laktik asit fermentasyonu, süt proteinlerinin sindirilebilirliğini büyük oranda geliştirmekte ancak protein antijenitesinde sağladığı azalma büyük ölçüde starter kültürün türüne ve fermentasyon koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Yapılan bir çalışmada *Lactococcuc lactis* ssp. *lactis, Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris, Lactococcus lactis* ssp. *cremoris, Lactococcuc lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis, Lactobacillus acidophilus* vb. bakterilerin, fermente pıhtıdaki peynir altı suyu proteinlerinin antijenitesini çiğ süte kıyasla %99 oranında azaltma özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Jędrychowski & Wróblewska, 1999). Laktik asit fermentasyonuyla, yağsız sütün ve tatlı peynir altı suyunun β-Lg antijenitesinde sırasıyla %70 ve %90 azalma sağlandığı (Kleber vd., 2006), *Lactobacillus helveticus ve Streptococcus thermophilus* bakterilerinin sinerjist etkisinin ise yağsız sütte α-La ve β-Lg antijenitesini en düşük düzeye indirdiği bildirilmiştir (Bu vd., 2010). *Aspergillus egypticus* ve *A. oryzae* gibi mantar türleri de mikrobiyal hidrolizde önemli kullanım alanlarına sahiptir. Bu mantarlar, LAB kadar ayrıntılı bir proteolitik sisteme sahip olmamasına rağmen peptid bağlarının parçalanması yoluyla proteinlerin hidrolizine katılan çeşitli proteazlar içerirler; bu sayede sınırlı proteoliz yoluyla, biyoaktif peptidlerin elde edilmesi yaygın bir kullanım sağlamaktadır (Hernández-Ledesma vd., 2011). GRAS olarak kabul edilen *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşları da mikrobiyel hidroliz için tercih edilen mayalar olup esas olarak süt proteinlerini parçalamak için kullanılmaktadırlar (Melville vd., 2011; Li vd., 2015). Bazı mayaların, LAB'dan bile daha

iyi proteolitik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Klein vd. (2002) mayaların β-kazeini parçalamada *L. helveticus* 'a kıyasla daha etkili olduğu saptamışlardır. Mikrobiyal fermentasyon, kullanılan substratın katma değerini yükselterek mikrobiyal olarak daha güvenli hale getirmekte ve substratın organoleptik, teknolojik, besinsel ve fonksiyonel özelliklerini geliştirebilmektedir (Leroy & De Vuyst, 2004). Mikrobiyal fermentasyonla canlı ve/veya ölü bakteri hücreleri, ekzopolisakkaritler ve bakteriyosinler gibi biyolojik özellikler sergileyen başka bileşikler de üretilebilmektedir. Ortamda oksijenin, rekabetçi mikroorganizmaların varlığı, süre, fermentasyonda kullanılacak şekerin türü, sınırlı veya sınırsız olması gibi faktörler doğru uygulanmadığı takdirde olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir (Melini vd., 2019). Bu nedenle, mikrobiyal fermentasyon yapılmadan önce uygun parametrelerin araştırılması son derece önemlidir. Kullanılan mikroorganizmaların çevresel koşullara duyarlı olması ve işlem sırasında pH, sıcaklık ve basınçtaki küçük değişikliklerin istenmeyen sonuçlara neden olabilmesi mikrobiyel hidroliz kullanımını sınırlandırmaktadır. Biyoteknolojik bir süreç olan mikrobiyal fermentasyon, partiler arasında tekrarlanılabilirlik açısından da zayıf nitelikli olup enzimatik hidrolizde kullanılan ticari enzimlere kıyasla standart hidrolizat olanağı sağlamamaktadır (Toldrá vd., 2018; Cruz-Casas vd., 2021).

2.3.3 Enzimatik Hidroliz

Proteinlerin fonksiyonel özelliklerini değiştirmenin ve modifiye etmenin en temel yollarından biri de enzimatik hidrolizdir. Proteinlerin enzimatik hidrolizi ile amid bağları ayrılır ve endoproteaz veya ekzoproteaz aktivitesine sahip proteazların uygulanmasıyla peptidler veya serbest amino asitler salınır (Hammershøj vd., 2008). Bu yöntemde hidrolizat elde etmek için farklı ticari enzimler kullanılarak proteinlerin peptid bağları parçalanır ve böylece şifrelenmiş peptidler serbest bırakılır (Şekil 2.3)**.** Proteolitik enzimler, hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal kaynaklardan elde edilmekte olup bitkisel ve hayvansal enzimlerin kullanımında bazı sınırlamalar bulunmaktadır (Arshad vd., 2018). Hayvansal kaynaklı proteazlar yaygın olarak doku ve organlarda üretildiği için bu tür enzimlerin izolasyonunda hayvanların kesim şekli önemli parametrelerdendir. Bitkisel kaynaklarda, proteazlar kabuktan veya gövdeden elde edilebilir, ancak canlılık, yetiştirme, iklim koşulları ve uzun ekstraksiyon işlemleri enzimin aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin kullanımı daha avantajlı ve tercih edilebilir niteliktedir. Mikrobiyal enzimler daha kararlı olmakla birlikte daha basit beslenme gereksinimine ve hızlı üretim sürecine sahiptirler. Enzim eldesinde

kullanılan mikroorganizmaların istenen özelliklerini oluşturmak, aktivitelerini ve performanslarını artırmak için genetik ve çevresel olarak manipüle edilebilmesi de kullanım avantajı sağlamaktadır (Cruz-Casas vd., 2021). Enzimin faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için önce substrata bağlanması ve ardından enzimatik kataliz ile devam etmesi gerekmektedir. Bunun için enzimler, substrat ile geçici bağlar oluşturan kalıntıları ve substrat ile reaksiyonu katalize eden kalıntıları içeren spesifik aktif bölgelere sahiptir. Bu şekilde sırasıyla bağlanma yerleri ve katalitik yerler oluşmaktadır. Enzim-substrat kompleksini oluşturan bağlar genellikle hidrojen bağları, hidrofobik bağlar veya Van der Waals etkileşimleridir. Enzim-substrat kompleksi belirli bir konformasyonda olduğunda, protein hidrolizi gerçekleşebilmektedir (Cruz-Casas vd., 2021). Yüksek kalitede emülsifiye edici özellikler için proteinlerin amfifilik karakterde olması gerektiği iyi bilinmektedir (Singh & Dalgleish, 1998). Proteinlerin polipeptid zincirlerinde hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlara sahip olması gerekmez, bu tür kısımlar sırasıyla sulu ve lipid fazlar ile etkileşim için gerekmektedir. Bu özellik esas olarak protein esnekliği tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle, globüler proteinler gibi rijit (geometrik) yapılara ve gömülü hidrofobik yapılara sahip proteinler emülgatör olarak kullanılmadan önce en iyi şekilde modifiye edilmelidirler.



Şekil 2.2 Enzimatik hidroliz akış şeması

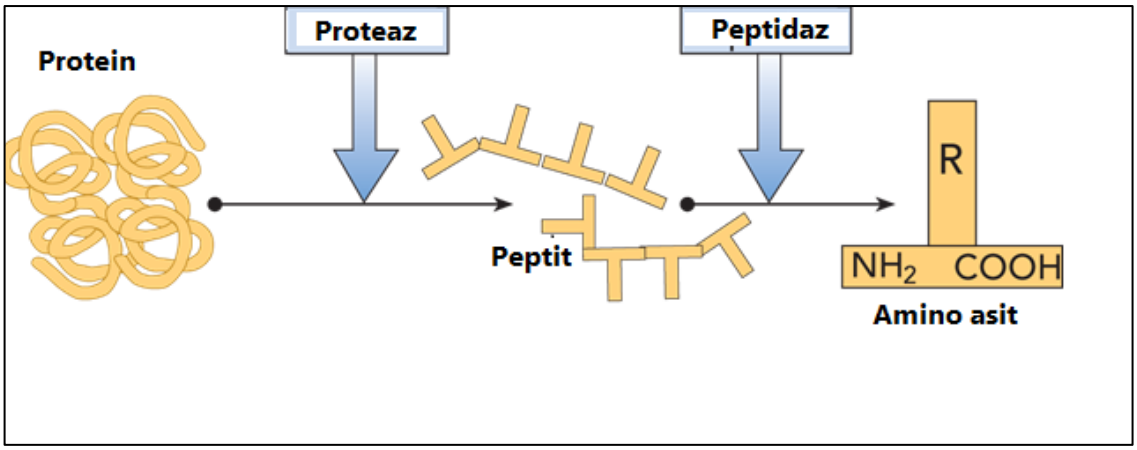
Enzimatik hidroliz genellikle üç şekilde gerçekleştirilebilir:

1) Geleneksel koşulları altında

2) İmmobilize enzimler kullanılarak

3) Ultrafiltrasyon membranları kullanılarak

Dezavantajları nedeniyle geleneksel koşullar altında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz daha az tercih edilmektedir. Enzimlerin maliyetlerinin yüksek, verim ve üretkenliklerinin düşük olması ve ayrıca enzimatik otoliz nedeniyle istenmeyen sekonder metabolitlerin oluşması yöntemin kullanımını sınırlandıran dezavantajlar olarak sıralanabilmektedir.

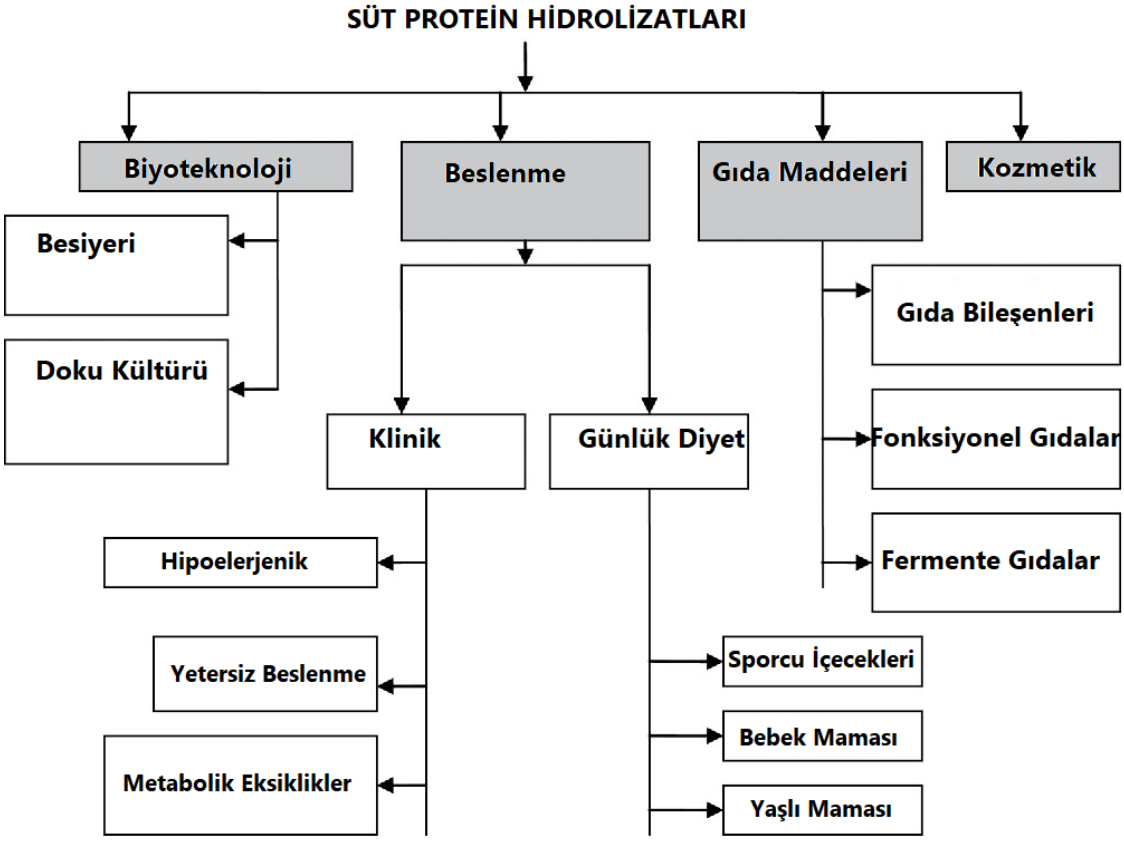


Şekil 2.3 Enzim-Substrat özgünlüğü ve enzimatik hidroliz mekanizması
(The Chemistry Of Milk | Dairy Processing Handbook - tetrapak.com)

Protein hidrolizatları, gıda sınıfı proteolitik enzimler veya uygun asitler-alkaliler kullanılarak "kısmi hidrolizle protein kaynaklarından üretilen polipeptidler, oligopeptidler ve amino asitlerin karışımları" olarak tanımlanmaktadır (Schaafsma, 2009). Asit ve alkali hidrolizinin kontrol edilmesi güç olduğundan proteinleri parçalanması için büyük ölçüde enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Ayrıca asit hidrolizi Cys ve Met'i oksitleyerek Ser ve Thr'yi kısmen yok ederken Gln ve Asn'yi Glu ve Asp asitlerine çevirerek proteinlerin kalitesini ve biyolojik değerini düşürmektedir. Öte yandan, alkali hidrolizi amino asitlerde rasemizasyona neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, proteinlerin enzimatik hidrolizi, katma değeri yüksek ürünler üretmek için ekonomik bir teknolojidir. Enzim katalizli hidroliz işlemi, hızlı reaksiyon hızı ve yüksek

özgüllük dahil olmak üzere çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, enzim hidrolizi optimum koşullar altında gerçekleştirilerek proteinlerde minimum değişiklikler elde edilir ve gıda sınıfı kalitesinde protein hidrolizatları üretilmesine olanak sağlamaktadır (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017). Proteoliz, proteinin moleküler ağırlığını azaltırken aynı zamanda konformasyonunu ve hidrofobikliğini de değiştirmektedir. Bu değişiklikler hidroliz için kullanılan proteazın özgüllüğüne, hidroliz derecesine (HD), enzim-substrat ilişkisine ve hidroliz edilen proteine bağlı olarak değişim göstermektedir. Enzimatik hidroliz işlemi farklı protein kaynakları için farklı kullanım olanakları sağlamak ve farklı yönlerini modifiye etmek amacıyla gerçekleştirilmektedir.

2.4 Süt Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları



Şekil 2.4 Süt protein hidrolizatlarının kullanım alanları **(**Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017)

Şekil 2.4'te gösterildiği gibi süt protein hidrolizatları insan beslenmesi başta olmak üzere farklı gıda uygulamalarında ve birçok alanda spesifik ürün bileşiminde yer almaktadır.

2.4.1 Beslenme

Protein hidrolizatlarının tüketiminin, hidrolize olamamış protein veya serbest amino asit karışımlarına kıyasla amino asitlerin daha hızlı alınmasına ve sindirilebilmesine neden olduğu yapılan bilimsel çalışmalarda belirtilmektedir. Ayrıca protein hidrolizatları, birkaç fizyolojik fonksiyon sergileyen biyolojik olarak aktif peptidlere sahip olabilir. Ek olarak, protein hidrolizatları, proteinlerle karşılaştırıldığında hipoalerjenik özellikler göstermektedir. Hidrolizatlar, amino asitleri yüksek oranda içermeleri, biyoaktif peptidlerce zengin nitelikte olmaları ve hipoalerjenik özellikleri sebebiyle yaşlı beslenmesinde kullanılan mama ve gıda takviyelerinde, kilo kontrolünde, sporcu beslenmesinde, bebek formülleri ve terapötik diyetler gibi tıbbi gıdalarda veya klinik tedavilerde ana bileşen olarak dahil edilmektedir. Bunların yanısıra emilim bozuklukları, kanser, travma veya yaşlılıkla ilişkili yetersiz beslenmeden muzdarip hastalar için de beslenme ihtiyacının karşılanmasında kullanılmaktadır (Clemente, 2000).

2.4.2 Biyoteknoloji Uygulamaları

Protein hidrolizatlarının, laboratuvarda yetiştirilen mikroorganizmaların geliştirilmesinde nitrojen gereksinimlerini sağlamak için uzun süredir kullanılmaktadır.

Günümüzde protein hidrolizatları;

-monoklonal antikorların, terapötik proteinlerin ve enzimlerin üretimi için hayvan hücre kültürlerinde,

-terapötik ilaçlar ve aşı üretimi için rekombinant kültürlerde,

-doku kültürleri; çeşitli son ürünler için bitki hücresi kültürleri,

-genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaları geliştirmek ve çoğaltmak için gerekli özel besiyeri ortamlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pasupuleti & Deman, 2010).

Protein hidrolizatları, probiyotiklerin, starter kültürlerin ve fermente ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Shobharani & Agrawal (2009) probiyotik kültür canlılığının, kazein hidrolizatı, sistein hidroklorür ve askorbik asit gibi tamamlyacıların eklenmesiyle arttığını göstermişlerdir.

2.4.3 Gıda Endüstrisi

Proteinlerin enzimatik hidrolizi özellikle teknofonsiyonel özelliklerin geliştirilmesi ve değiştirilmesi için tercih edilmektedir. Örneğin emülsiyon aktivite ve stabilite karakterleri

geliştirilen protein hidrolizatları özellikle et ve et ürünleri tekonolojisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Neklyudov vd., 2000).

2.4.4 Hayvan Yemi

Çiftlik hayvanlarının üretkenliği büyük ölçüde yemin kalitesine, özellikle de yüksek kaliteli proteinlere bağlıdır. Karışık kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatları, hayvan yemine dahil edilerek yüksek protein kalitesine sahip ürünlerin üretimine olanak sağlanabilmektedir. Yüksek et kalitesi, süt verimi için hayvan beslenmesinde hidrolizat katkılı yem kullanımı oldukça etkili olmaktadır (Gilbert vd., 2008).

2.4.5 Fermentasyon Endüstrisi

Mikrobiyal kültürlerin performansını iyileştirmek, fermentasyon verimliliğini artırmak için fermentasyon endüstrisinde kullanılan mikrobiyal kültürlerin nitrojen ihtiyaçlarını daha erişilebilir biçimde sağlayan protein hidrolizatları tercih edilmektedir.

2.4.6 Kozmetik Endüstrisi

Bitki ve hayvan kaynaklarından elde edilen enzimatik protein hidrolizatları, kişisel bakım ürünlerinde özellikle de cilt ve saç bakım maddelerinde farklı ihtiyaçların giderilmesi için formülize edilebilmektedirler. Saç, tırnak ve derideki hasarın giderilmesi ve ilarleyen yaşla birlikte meydana gelen kayıpların azaltılması adına kollajen başlıca olmak üzere kazein ve serum proteinlerinin hidrolizatları birçok krem ve kişisel bakım ürününde formülasyonda yer almaktadır.

2.5 Hidrolizatların Teknolojik Özellikleri

Süt proteinleri anahtar fonksiyonel bileşenlerdir ve eklendikleri gıda ürünlerine ve gıda sistemlerine istenen özellikleri sağlamaktadır. Tablo 2.2'de çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı teknolojik özellikleri gösterilmiştir. Gıda proteinlerinin teknolojik fonksiyonelliği, genellikle su bağlama, çözünürlük, viskozite ve jelleşme gibi karakterleriyle ilgili olan hidrodinamik; emülsifikasyon, köpürme ve film oluşumu gibi karakterleriyle ilgili olan hidrasyon olmak üzere iki tekno-fonksiyonel özellikten ileri gelmektedir. Son on yılda, süt proteinlerinin endüstriyel üretimine uygun teknolojiler geliştirilmiş ve böylece farklı kalite ve türde proteinle zenginleştirilmiş birçok ürün ortaya çıkmıştır (Korhonen, 2009). Süt proteinleri gelişmiş fonksiyonel özellikler için modifiye edilebilmektedir. Enzimatik hidroliz bu değişim, modifikasyon ve zenginleştirme

işlemleri için en uygun tekniklerden birisi olarak aktif olarak kullanılabilmektedir. Enzimatik hidroliz, protein üçüncül yapısını bozmakta ve proteinin moleküler ağırlığını azaltmakta, peptidlerin kendileriyle ve çevreyle etkileşimini arttırmakta ve sonuç olarak fonksiyonel özelliklerini değiştirmektedir (Liu vd., 2010).

Tablo 2.2 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı teknolojik özellikleri

Protein kaynağı	Kullanılan enzim	Etki mekanizmaları	Hidroliz derecesi	Sıcaklık-süre parametreleri	Modifiye edilen teknolojik özellikler	Referans
Sodyum kazeinat	Papain Pankreatin Tripsin	Endoproteaz		pH 7,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk. pH 8,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk. pH 8,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk.	Hidrolizatların asidik pH'daki çözünürlükleri artırılırken, bütün hidrolizatlarda emülsiyon özelliği artmıştır.	Luo vd., (2014)
Sodyum kazeinat	Protameks (Staphylococcus aureus V8)	Endoproteaz	%2,7 %5,3 %13,3	pH 7,0/40°C/5–120 dk.	Çözünürlük, köpük oluşturma kapasitesi ve emülsiyon özellikleri hidrolize edilmeyen örneğe göre önemli düzeyde geliştirilmiştir.	Flanagan & FitzGerald (2002)
Peynir altı suyu izolatı	Alkalaz 2.4L	Endoproteaz	%10,0–20,3	pH 8,0/45°C/5–120 dk.	Artan hidroliz derecesiyle birlikte jelleşme özellikleri artmıştır.	Doucet vd., (2001)
Peynir altı suyu izolatı	Alkalaz 2.4L	Endoproteaz	%12,0–19,2		%16,9 hidroliz derecesi hidrolizatlarda daha yumuşak bir jel oluş turmuştur.	Doucet vd., (2001)
Peynir altı suyu konsantresi	Prolyve 1000TM	Endoproteaz	%10,0–15,9	pH 7,0/50°C/30–300 dk.	Hidrolizatların jel oluşumunda bir farklılık tespit edilmemiştir.	Spellman vd., (2005)
Peynir altı suyu proteini konsantresi	Flavourzyme 500L	Endoproteaz Ekzoproteaz	%19,4	pH5,0/50°C/120 dk.	Çözünürlükte artış, ısı stabilitesinde ve emülsiyon aktivite indeksinde azalma tespit edilmiştir.	de Castro & Sato (2014)
Peynir altı suyu proteini konsantresi	Papain Pankreatin Tripsin		%13,32–22,06 %9,42–20,91 %14,86–20,68	pH 7,0/37°C/10 min–24 sa. pH 7,0/37°C/10 min–24 sa. pH 7,0/37°C/10 min–24 sa.	Çözünürlük enzim tipine göre değişiklik gösterdi. Papain ile muamele edilmiş hidrolizatlar en yüksek çözünürlüğü sergilerken onu sırasıyla tripsin ve pankreatin takip etmiştir.	de Castro & Sato (2014)
Peynir altı suyu protein izolatı	Kimotripsin	Endoproteaz	%10,6	pH 7,8/37°C/180 dk.	Kimotripsin hidrolizatlar nanoemülsiyon oluşturmamıştır.	Adjonu vd., (2014)

Tablo 2.2 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı teknolojik özellikleri (devamı)

Peynir altı suyu protein izolatı	Pepsin	Endoproteaz	%11	pH 2,6/37°C/180 dk.	Pepsin hidrolizatlar nanoemülsiyon oluşturmamıştır.	Adjonu vd., (2014)
Peynir altı suyu protein izolatı	GluC	Endoproteaz	%8,2-11,7	pH 7,7/55°C/5 sa.	Emülsiyon aktivite ve stabilitesi geliştirilmiştir.	Feng vd., (2019)
Peynir altı suyu protein izolatı	Korolaz N	Endoproteaz	%4,2	pH 8,0/37°C/10 sa.	Fibralasyon edilen hidrolizatlarda köpük stabilitesi artarken, çözünürlük azalmıştır.	Mohammadian & Madadlou (2016)
Süt protein konsantresleri	Kimotripsin Tripsin Pepsin Papain	Endoproteaz	%24,3–24,4 %14,8–15,1 %5,0–5,7 %7,2–9,8	pH 8,0/50°C/5–10 dk. pH 8,0/37°C/10–60 dk. pH 2,0/37°C/240–720 dk. pH 6,8/60°C/30–180 dk.	Çözünürlük iyileştirildi. Yüzey hidrofobikliği ve jel kuvveti azaltıldı. Emülsifikasyon kapasitesi artırılmıştır.	Banach vd., (2013)
Süt protein konsantresleri	Flavourzyme Nötraz Protameks		%15,6-37,1	pH 7,0/50°C/180 dk.	Yüksek hidrolizin emülsiyon stabilitesini azaltmıştır. Emülsiyon kararsızlığı, hidrolitik enzime bağlı olarak, artan DH ve <1 kDa artan peptid içeriği ile artmıştır.	Ryan vd., (2020)
Süt protein konsantresleri	Flavourzyme Alkalaz Protameks	Endoproteaz Ekzopeptidaz	%11,9 %15,7 %13,6	pH 7,0/50°C/180 dk. pH 8,5/55°C/180 dk. pH 6,5/50°C/180 dk.	Bir endopeptidaz olan alkalaz, flavourzyme ve protemaxa göre daha yüksek hidroliz derecesi sağlamıştır. Hidroliz işlemi bütün örneklerde çözünürlüğü önemli ölçüde artırmıştır.	Cui vd., (2021)

Protein modifikasyonu pH, sıcaklık, hidroliz derecesi ve enzim özgüllükleri gibi reaksiyon koşulları ve iyonik kuvvet, kalsiyum konsantrasyonu, polivalan (çok değerli) iyonlar, şekerler ve hidrokolloidler gibi her bir besinin kendine özgü olan yapısal özellikleri dahil olmak üzere birçok hidroliz parametresinden etkilenmektedir (Tablo 2.2). Bir çalışmada papain ile elde edilen hidrolizatlar, sodyum kazeinatın çözünürlüğünü geliştirme konusunda daha büyük bir yetenek sergilerken bunu sırasıyla tripsin ve pankreatin izlemiştir (Luo vd., 2014). Papain, geniş substrat özgüllüğü sergileyen ve spesifik olarak arginin, lizin ve fenilalanin bağlarını hidrolize eden bir sistein endopeptidazdır (Nongonierma & FitzGerald, 2011). Papainin açık konformasyonu, süt protein moleküllerini daha küçük peptidlere hızlı ve kapsamlı bir şekilde parçalamasına olanak sağlamaktadır. Ağırlıklı olarak C-terminalinden kaynaklanan bu açık komformasyon, parçalanmanın etkisiyle hidrofilik bir yüzey oluşumuna ve protein çözünürlüğünün artmasına neden olur (Yao vd., 2013). Tripsin, sadece lizin ve arjinin kalıntılarının karboksilik grubunu içeren peptid bağlarını hidrolize eden çok daha dar bir özgüllüğe sahip bir serin proteazlar grubunda yer almaktadır (Bougatef, 2013). Pankreatin ise proteinlerde daha fazla hedef parçalanma bölgesine sahip olan ve proteini daha rastgele hidrolize edebilen, lipaz, amilaz, tripsin, kimotripsin ve elastaz dahil birçok proteolitik enzimleri içeren enzimatik bir komplekstir. Pankreatin, N-terminal fosforlu bölgeleri, C-terminal hidrofobik bölgeleri, beta-kazeinin orta bölgesini, αs1- kazeinin terminal bölgelerini ve αs2-kazeinin hem terminallerini hem de orta bölgesini ayırmaktadır. Spesifiklikleri nedeniyle, pankreatin ve/veya tripsin ile enzimatik hidrolizden üretilen peptidler arasındaki etkileşimler artabilir ve papainle elde edilen hidrolizatlara kıyasla daha az protein çözünürlüğüne sahip hidrolizat eldesi ile sonuçlanabilmektedir (Luo vd., 2014; Su vd., 2012).

2.5.1 Yağ Bağlama

Proteinlerin yağı bağlama yeteneği, yağ bağlama kapasitesi olarak bilinir ve başlıca protein türü olmak üzere iyonik kuvvete, partikül boyutuna, ortamda kalsiyum vb. diğer çözünen bileşenlerin konsantrasyonuna ve pH'ya bağlı değişim göstermektedir (Patil vd., 2018). Yağ emiliminin mekanizması, çoğunlukla yağın fiziksel olarak tutulmasına ve dolayısıyla daha yüksek kütle yoğunluğuna sahip proteinin daha fazla yağ emilimine atfedilmektedir. Gıda uygulamaları yanısıra farmokoloji, kozmetik gibi birçok alanda ana- yardımcı bileşen olarak yaygın bir kullanım alanına sahip olan süt proteinlerinde yağ bağlama kapasitesinin geliştirilmesi kullanım avantajı sağlamaktadır. Yağ bağlama

yeteneğinin geliştirilmesi çözünürlükte olduğu gibi diğer teknolojik karakterlerin istenilen seviyede geliştirilmesi ve değiştirilmesi için büyük önem teşkil etmektedir. Örneğin protein numunesinin ürüne işlenebilme ve diğer bileşenlerle interaksiyonunun sağlanabilmesi ve oluşturulan teknolojik karakterlerin depolama boyunca sürdürülebilmesi için temel parametrelerden biri olan emülsiyon özelliklerinin oluşabilmesi yağ bağlama yeteneği ile yakından ilişkilidir. Özellikle et ve şekerleme ürünlerinde önemli bir fonksiyon olan yağ bağlama kapasitesi, yağın fiziksel olarak tutulmasının ve malzemenin hidrofobikliğinin (yüzey hidrofobisitesinin) interaksiyonuna göre şekillenmektedir (Sathivel vd., 2004). Protein hidrolizatlarının hidrofobikliği, hidrolizin protein zincirini parçalaması ve böylece daha fazla hidrofobik grubun açığa çıkmasıyla gelişmektedir (Kristinsson & Rasco, 2000). Enzimatik hidrolizin her bir özellik üzerinde meydana getirdiği değişimde etkin rol oynayan enzim çeşidi, hidroliz derecesi ve diğer çevresel koşullar yağ bağlama kapasitesini de önemli düzeyde şekillendirmektedir (Tablo 2.2). Sathivel vd. (2005), farklı ticari enzimler ile kırmızı somon proteinini hidroliz ettikleri çalışmada hidroliz derecesi ile yağ bağlama kapasitesinin tam olarak bir paralellik göstermediğini, hidrolizatlarının yağ bağlama kapasitesinin belirli bir zaman aralığında arttığını, hidrolizin daha fazla uzatılması durumunda ise azaldığını tespit etmişlerdir.

2.5.2 Yüzey Hidrofobikliği

Yüzey hidrofobikliği statik bir faktör olarak proteinlerin emülsifiye edici özelliklerini karakterize etmek için önemli bir indekstir ve proteinlerin konformasyonları ve esneklikleri (dinamik faktör) ile yakından ilgilidir (Yan vd., 2021). Yapılan çalışmalar, yüzey hidrofobikliğinin, bir protein yüzeyinin bağlayıcı bir ligandla (merkezî bir metale bağlanan bir atom, iyon veya molekül) etkileşime girme olasılığı en yüksek bölgelerini belirlemek için kullanılabileceğini göstermektedir (Young vd., 1994). Bir proteinin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri, moleküler esnekliği üzerinde önemli etkilere sahiptir. Enzimatik işlemler, ısıl işlemler, ultrases, fermentasyon vb. modifikasyon yöntemleri protein ve peptidlerin moleküler esnekliği üzerinde dolayısıyla da yüzey hidrofobikliğinde değişimlere neden olmaktadır. Böylece yüzey hidrofobisitesi protein ve peptidlerin başlıca emülsiyon özellikleri olmak üzere birçok teknolojik ve fonksiyonel özelliğinin şekillenmesinde etkili olmaktadır. Hidroliz muamelesi yüzey hidrofobikliğini artırarak yapıda bulunan gömülü hidrofobik grubun daha fazla açığa çıkmasına sebep olmakta böylece yağ/su arayüzünde adsorpsiyonu, çözünürlüğü ve emülsifiye etme

kabiliyetini geliştirmektedir (Tablo 2.2). Yan vd. (2021) farklı güç düzeylerinde ultrason uygulayarak soya proteininde yüzey hidrofobisitesi ve buna bağlı olarak değişen diğer tekno-fonksiyonel özellikleri incelemişler ve proteinin yüzey hidrofobisitesinin diğer özellikler ile etkileşimini tespit etmişlerdir. En yüksek güçte ultrason uygulaması (400W) ile proteinlerde molekül yapısının daha esnek hale geldiği, yüzey hidrofobisitesine bağlı olarak da çözünürlük, emülsiyon özelliklerinde önemli düzeyde artış meydana geldiği bildirmişlerdir.

2.5.3 Jelleşme

Enzimatik hidroliz, hidrolize edilmeyen proteinlerden daha az hidrofobik özelliklere ve daha fazla yüke sahip peptidlerin salınmasına neden olmaktadır. Bu durum peptid fragmanları arasındaki etkileşimleri sonuç olarak da jel oluşumunu azaltabilmektedir. Uygun enzimin seçimi, protein hidrolizinde merkezi bir rol oynamaktadır. Farklı etki mekanizmalarına sahip spesifik süt proteini substratları ve proteazları kullanarak substrat-enzim spesifitesinin sağlanması ile jelleşme vb. karakterlerde iyileştirme sağlanabilmektedir (Su vd., 2012). Süt proteini hidrolizatlarının jelleşme özellikleri, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerin katkısıyla, hidrofobik peptid kümeleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Spellman vd. (2005) aynı hidroliz koşulları altında iki ticari proteaz preparasyonu ile gerçekleştirilen hidrolizde elde edilen peynir altı suyu proteini konsantrelerinin, enzimlerin karakteristiğine bağlı olarak farklı agregasyon özelliklerine sahip protein hidrolizatları ile sonuçlandığını göstermektedir. Agregasyon, jelleşme kapasitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilmektedir. Peynir altı suyu protein konsantresi hidrolizi için her ikisinin de ana proteolitik bileşeni Subtilisin Carlsberg olan alkalaz 2.4L ve Prolyve 100TM enzimlerini kullanılmış ve elde edilen hidrolizatların farklı parçalanma dereceleri yanısıra jelleşme özelliklerinde de önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Subtilisin proteazları, nispeten düşük substrat özgüllüğüne sahip serin proteazlardır ve tercihen büyük β-dallı olmayan hidrofobik kalıntılardan sonra peptid bağlarını parçalamaktadır (Spellman vd., 2005). Her iki enzimin de subtilisin aktiviteleri olmasına rağmen Alkalaz 2.4L enzimi, Prolyve 100TM'de bulunmayan spesifik bir glutamil endopeptidaz aktivitesi göstererek glutamik asit ve daha az ölçüde aspartik asit kalıntılarından sonra peptid bağlarını ayırmaktadır. Bu durum, Alkalaz 2.4L enziminin kazein fosfopeptidleri ve peynir altı suyu proteinleri gibi C-terminalinde glutamik asit kalıntıları olan substratları parçalama yeteneğini açıklamaktadır. Dolayısıyla Alkalaz 2.4L'deki glutamil endopeptidaz aktivitesi peynir altı

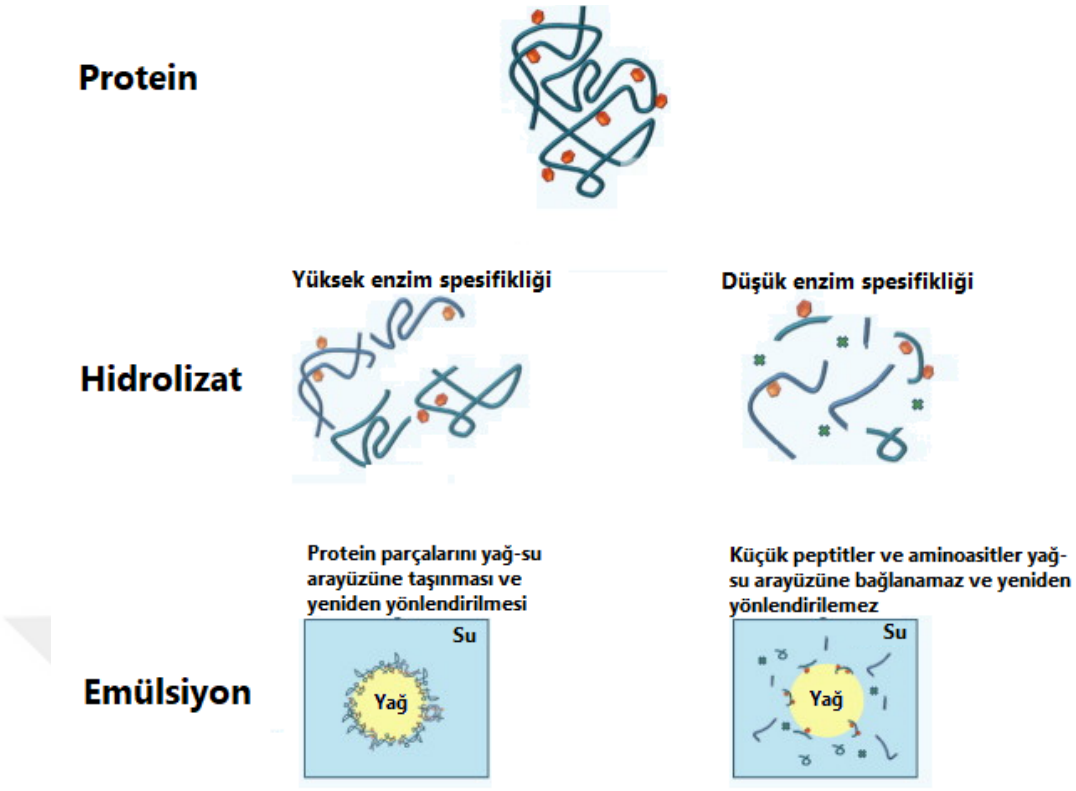
suyu proteini konsantresinin jelleşme özelliklerini aynı ana bileşenli Prolyve 100TM enzimine kıyasla çok daha fazla geliştirmektedir (Su vd., 2012; de Castro vd., 2015).

2.5.4 Emülsiyon Özellikleri

Bir sistemde yağ ve su fazının kararlı bir şekilde bir arada bulunması, iyi emülsifikasyon yeteneği gerektirmektedir. Normalde karışmayan bir fazın diğerine dağılması, mekanik enerji ihtiyacı gerektirmesi yanısıra arayüzey alanının artmasına sebep olmaktadır. Bu termodinamik kararsızlık, fazlar arasındaki arayüzey gerilimini azaltabilen sürfaktanlar tarafından stabilize edilmedikçe, iki fazın hızla ayrılmasına neden olmaktadır. Emülsiyonlar, özellikle nanoemülsiyonlar, gıda ve ilaç endüstrilerinde suda çözünürlüğü az olan biyoaktif bileşikleri ve ilaçları ürün kompozisyonunda sağlayabilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel emülsiyonlar, mekanik kesme ile oluşturulan tamamen veya kısmen karışmayan iki sıvının dispersiyonu şeklindedir. Proteinler, amfifilik özelliklerinden dolayı ve ara yüzeyde açılıp yeniden yönlendirilebildikleri için emülgatör olarak kullanılmaktadır (Lam & Nickerson, 2013). Bu makromoleküller zayıf stabilizasyon sağlayan ve uzun süreli kullanım için toksikolojik etkileri olabilen yaygın emülgatörlerin yerine kullanılmaktadır. Süt proteinleri iyi bir emülsifiye etme kapasitesine sahiptir. Süt proteinlerin hidrolizi, emülsifikasyon kapasitesini iyileştirmek için disülfit ve polar olmayan bağlar gibi emülsiyon damlacıklarının ara yüzünde yeni etkileşimlere izin vererek üçüncül yapının içine gömülü gruplarını açığa çıkarmaktadır (He vd., 2013; Lam & Nickerson, 2013). Luo vd. (2014) kazeinin hidrolizinde papain ve tripsin enzimlerini kullanmışlar ve hidroliz muamlesinin proteinin yüzey hidrofobikliğini azalttığını tespit etmişlerdir (Tablo 2.2). Ancak aynı çalışmada kullanılan pankreatinin, yüzey hidrofobisitesini hidrolizin ilk 4 saatinde artırmasına karşın 24. saatten sonra önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Emülsiyon aktivite (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksleri (ESI), 1 sa. sonra papain muamelesi ve 24 sa. sonra pankreatin muamelesi dışındaki bütün hidrolizlerde de üç proteaz kullanımıyla arttığı bildirilmiştir. Kazeinin tripsin ile hidrolizinde, papain ve pankreatine kıyasla 24 sa. sonra daha yüksek bir EAI ve ESI ile sonuçlanmıştır. Tripsinin papainle neredeyse aynı hidroliz derecelerinde parçalanma meydana getirmesine karşılık, çok daha yüksek substrat özgüllüğü göstermesi daha güçlü emülsiyön özelliği göstermesini açıklayabilir. de Castro & Sato (2014), flavourzyme 500L proteaz kullanarak 2 sa. hidrolize edilen peynir altı suyu proteininin %12 oranında azalmış bir emülsiyon aktivite indeksine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Flavourzyme 500L, çeşitli peptid bağlarını hidroliz ederek yüksek

derecede hidrolizi teşvik eden *Aspergillus oryzae*'den nötr bir proteaz olmasına karşın emülsiyon aktivitesinde azalma etkisi göstermiştir. Banach vd. (2013), süt protein konsantresinin kimotripsin ve tripsin ile hidrolizinin, protein hidrolizatlarında EAI ve ESI' sini arttırdığını, ancak papainin bu indeksleri değiştirmediğini gözlemlemişlerdir. Bu gözlemler, proteazın substrat özgüllüğü sayesinde, peptidin karışmayan bir sıvı emülsiyonun arayüzüne adsorbe etme yeteneğini geliştiren yüzey üzerinde spesifik etkileşimli bölgelere ve spesifik moleküler kütlelere sahip farklı hidrolizat ürünlerine olanak tanıdığını göstermektedir. Yüksek hidroliz dereceleri, proteinlerin emülsifiye edici özelliklerini azaltan büyük miktarlarda serbest amino asitler ve kısa zincirli peptidler üretebilmesini sağlamaktadır. Buna karşın, sınırlı proteoliz muamelesi emülsiyonu güçlendiren hidrofobik ve hidrofilik kalıntıları ortaya çıkarmaktadır. Hidroliz işlemi, proteinlerin amfifilik özelliklerini geliştirmekte ve emülsifikasyonu iyileştirmektedir (Nongonierma & FitzGerald, 2011; Scherze & Muschiolik, 2001; Tavano, 2013).

Singh & Dalgleish (1998) çalışmalarında, %8 ile %45 HD arasında değişen peynir altı suyu proteinlerinin ticari hidrolizatlarını, soya fasulyesi yağı ile emülsiyon yapmak için kullanmışlardır. Bu emülsiyonların stabilitesi hem oluşumdan hemen sonra hem de depolamadan sonra emülsiyon damlacıklarının ortalama boyutunun ve bunların boyut dağılımının belirlenmesiyle ölçülmüştür. Parçacık boyutlarına paralel olarak maksimum emülsiyon kapasitesi %10 veya %20 hidroliz derecesine sahip olan hidrolizatlarla elde edilen emülsiyonlarda tespit edilmiştir. Daha yüksek hidroliz dereceleri, emülgatör olarak hareket edemeyecek kadar küçük peptidlerlerin ortaya çıkmasına sebep olduğu için emülsiyon özelliklerini zayıflatmıştır. %10'un altında hidroliz derecesi ise çözünürlüğü azaltarak hidrolizatların yağı emülsifiye etme yeteneğini de azaltmıştır. Hazırlanan emülsiyonların tamamı 122°C'de 15 dk. ısıtılmaya karşı kararlı bir yapı sürdürememesine karşın, daha düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatlarla hazırlanan emülsiyonların 90 °C'de 30 dk. ısıtılmaya dirençli olduğu tespit edilmiştir (Singh & Dalgleish, 1998). Emülsiyon oluşumundan sonra farklı peptidlerin karıştırılması, sınırlı bir ölçüde, emülsiyon stabilitesini değiştirebilmektedir. Bu bulgular çoğu gıda ve gıda dışı kullanımı için hidrolizatlarla çok daha kararlı ve stabil emülsiyonlar elde edilebileceğini desteklemektedir (Kilara & Panyam, 2003).



Şekil 2.5 Yüksek ve düşük enzim spesifikliğine sahip proteolitik enzimlerin ve emülsifiye edici özelliklere sahip peptid üretimine etkileri (de Castro vd., 2015)

Süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi, fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir ve gıda proteini işlemede en sık kullanılan araçlardan biri haline gelmektedir. Proteolitik enzimlerin özgüllüklerine ve etki mekanizmaları dikkate alınarak yapılan hidroliz işlemleriyle, arzu edilen özelliklere sahip süt proteini hidrolizatları üretmek mümkündür. Süt proteinlerinin amino asit kalıntılarının bileşimi, dağılımı ve etkileşimleri dahil olmak üzere hidroliz bölgelerinin değerlendirilmesi, çözünebilirlik, jelleşme ve emülsifikasyon gibi fonksiyonel özelliklerinin düzenlenmesi için temel oluşturmaktadır. Farklı proteolitik enzimlerin etki mekanizmalarına ve substrat özgüllüklerine dayanarak, gıda ve ilaç endüstrisindeki belirli uygulamalar için gerekli fonksiyonel özellikleri dengeleyen süt proteini hidrolizatlarını modüle etmek mümkündür.

Süt proteinlerinin enzimatik hidrolize dayalı modifikasyonu, proteinlerin tekno-fonksiyonel, biyolojik ve besleyici özelliklerini optimize etmek için gıda proteini işlemede bir araç olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Çeşitli çalışmalar, süt proteinlerinin sınırlı hidrolizinin protein çözünürlüğünün, ısı stabilitesinin, emülsiyon kapasitesinin, köpürme özelliklerinin ve yüzey hidrofobikliğinin artmasıyla

sonuçlandığını göstermiştir (Ryan vd. 2020; Banach vd. 2013; Bozkurt vd. 2021; de Castro & Sato 2014). Bu da hidrolizatları süt ürünleri de dahil olmak üzere diğer gıda maddelerinde kullanıma çok daha uygun hale getirmektedir.

2.5.5 Çözünürlük

Çözünürlük, birçok fonksiyonel özelliğin gerçekleşebilmesi için temel bir ön koşul olarak kabul edilmektedir. Çözünürlük, protein hidrolizatlarının en önemli fonksiyonel özelliklerinden biridir ve gıdalardaki protein ve hidrolizat kullanımlarını büyük ölçüde belirlemektedir. Bu parametre, moleküler ağırlıktaki azalma ve enzimatik hidrolizle daha küçük, daha hidrofilik ve polipeptid birimlerinin sayısındaki artışla yüksek oranda ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak açığa çıkan net yük yoğunluğunda bir artış meydana gelmektedir (Zhao vd., 2012). Enzimatik hidrolizden sonra protein molekülünde daha fazla hidrofobik grubun açığa çıkması çözünürlükte bir azalma meydana getirebilmektedir. Bu nedenle süt proteinlerinin çözünürlüğünü iyileştirmek için sınırlı ve seçici hidroliz muamelesi kritik faktör olarak değerlendirilebilmektedir (Liu vd., 2010). Üç farklı proteazla gerçekleştirilen karşılaştırmalı bir çalışmada, sodyum kazeinat hidrolizatların çözünürlüğünün enzim türüne göre değiştiğini ve enzimlerin özgüllükleri ile ilginç bir değişim ortaya koyduğunu göstermektedir (de Castro vd., 2015).

2.5.6 Köpük Oluşturma

Sürekli bir sıvı fazda havanın dağılması, geniş bir arayüzey alanı oluşturmaktadır. Bu hava-su arayüzünün proteinler veya peptidler gibi yüzey aktif maddeler tarafından dengelenmesi, köpük oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Arayüzdeki proteinlerin rolü ve davranışı, peptid zincirinin birincil ve ikincil yapısı tarafından yönetilmektedir (Kilara & Panyam, 2003). Dondurma, pasta kreması, kapuçino gibi farklı nitelikte kahve çeşitleri, marşhmelov benzeri çok çeşitli ürünler kimliklerini ve yapılarını süt proteinlerinin köpürme özelliklerinden alır. Süt proteinlerinin enzimatik modifikasyonu, farklı köpürme özelliklerine sahip peptidler üretilmesine olanak tanıyarak süt proteinlerinin farklı ürün gruplarında gıda bileşen olarak kullanılmasına fırsat tanımaktadır. Kazein; tripsin, kimotripsin, alkalaz, nötraz, pronaz, pepsin, asit fungal proteaz ve prozim enzimleri kullanılarak %5 veya %10 hidroliz derecesine kadar parçalanmış ve hidrolizatların pH 4,2'de %100 çözünür nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Köpürme karakterleri, hidroliz derecesi ve enzim çeşidine göre farklılık göstermekle birlikte bazı enzimler kontrol yani hidrolize olmayan kazein örneği kadar köpürmüştür. Genel olarak bakıldığında ise %10

hidroliz derecesi %5 hidroliz derecesine kıyasla daha sınırlı bir köpük oluşum etkisi göstermiştir. Sadece asit pH'da optimum olan enzimler daha kararlı ve stabil köpük oluşumu sağlarken, asit fungal enzimlerin ürettiği molekül ağırlığı <10.000 olan peptidler ile kararlı köpük miktarında ve stabilitesinde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Patel, 1994; Kilara & Panyam, 2003).

2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim

Proteinlerin ikincil yapısı, proteini oluşturan bileşenlerin kimyasal ve yapısal özelliklerinin anlaşılabilmesi, fonksiyonel karakterlerinin tanımlanabilmesi, sindirim davranışları, biyoaktif özellikleri ve besin değerlerinin karakterizasyonu için hayati önem taşırmaktadır. Proteinlerin ikincil yapıları, az sayıda β-dönüşü ve rasgele sarmallarla birlikte esas olarak α-heliks ve β-sheet'i içermektedir. Bu iki yapının protein ikincil yapılarındaki yüzdesi, proteinin besleyici değerini, kalitesini ve sindirim davranışını etkilemektedir. β-sheet yapısının yüksek bir oranda bulunması, kısmen gastrointestinal sindirim enzimlerine düşük erişime neden olabilmekte bu da düşük bir protein değeri ile sonuçlanabilmektedir (Yu, 2005). Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, proteinlerin konformasyonu araştırmak ve incelemek için yaygın olarak kullanılan en temel tekniktir. FTIR spektroskopisi, proteinin yapısı ve ortamı hakkında zengin bilgi sağlamakla birlikte, süt ürünlerindeki konformasyonel değişiklikler de dahil olmak üzere protein yapısını incelemek için çok uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Amid I bandı yaklaşık 1650 cm^{-1}'de bulunur ve esas olarak CO gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Konformasyonel Amid I bölgesi (1600–1700 cm^{-1}), proteinlerin ikincil yapısını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. İkincil yapıda meydana gelen bu değişimler, proteinleri tekno-fonksiyonel ve biyoaktif karakterlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Haque vd. (2010) yüksek protein içerikli süt ürünlerinin çözünürlüğü ve yapısı arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik gerçekleştirdikleri bir çalışmada, süt protein konsantrelerinde çözünürlüğünün depolama ile birlikte önemli ölçüde azaldığını ve FTIR spektrumlarından protein ikincil yapısında ve β-sheet yapısında azalmaların meydana geldiğinin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yine başka bir çalışmada (Kher vd. 2007), depolama ile bir süt protein konsantresinin çözünürlüğü önemli ölçüde azaldığında, FTIR spektrumlarından 1630 cm^{-1}'de bantların yoğunluğunda ve/veya konumunda değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Protein hidrolizatları peptid

karışımları olduğundan, spesifik peptidleri tanımlamak imkânsız değilse de çok zor olmaktadır. Bununla birlikte, hidrolizatları tanımlamak ve ‘‘kara kutu" sistemi olarak düşünülebilen FTIR spektrumları ile fonksiyonel özellikler arasındaki ilişkilerin araştırılmasında ikincil yapıdaki değişimler güçlü bir araç olarak düşünülebilmektedir.

2.7 Protein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özellikleri

Gıda kaynaklı peptidlerin, temel beslenme rollerine ek olarak yararlı biyolojik aktiviteler sergileyebildikleri iyi bilinmektedir. Tablo 2.3’te çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı biyoaktif özellikleri gösterilmiştir. Bu biyoaktif peptidler nispeten kısadır (tipik olarak 2-20 amino asit) ve insan sağlığının korunmasında veya geliştirilmesinde potansiyel bir rolü olan antioksidan, antienflamatuar, antihipertansif, antimikrobiyal ve antikanser özelliklere sahiptir (Bamdad vd., 2017). Süt ürünleri, biyolojik değeri yüksek proteinlerin ve biyoaktif peptidlerin en önemli kaynaklarından biridir. Yapılan çalışmalar sütten elde edilen biyoaktif peptidlerin ve proteinlerin bir dizi fizyolojik süreç üzerinde etkilere sahip olabileceği ve böylelikle potansiyel olarak çeşitli insan hastalıklarının önlenmesine yardımcı olabileceği fikrini desteklemektedir (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Süt proteinleri; endojen süt enzimleri, mikrobiyal enzimler, starter kültür enzimleri, peynir mayası üretimindeki enzimler ve ayrıca gastrointestinal sistemdeki sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilerek sağlığı teşvik edici özelliklere sahip birçok biyoaktif peptidin eldesinde kullanılmaktadır. Süt proteinlerinden elde edilen peptidlerin fonksiyonel önemi ve sağlık yararları, biyoyararlanımlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Peptidler, yalnızca reseptörlerle etkileşimleri sırasında kararlı doğal yapıları korunursa biyolojik olarak aktivite gösterebilmektedir.

2.7.1 Antioksidan Kapasiteleri

Süt proteinleri çok yönlü antioksidan etkiler gösteren mekanizmalara sahiptir (Tablo 2.3). Süt proteinlerinde reaktif oksijen türlerini (serbest radikalleri) yakalayan, metalleri şelatlayan ve reaktif oksijen türlerinin üretimini ve ortadan kaldırılmasına katılan enzimleri modüle etmekte olan sistemler bulunmaktadır (Bottani vd., 2020). Süt proteinlerinin en temel fraksiyonu olan kazein fraksiyonları, antioksidan peptidler dahil olmak üzere birçok biyopeptidin öncüsüdür (Power vd., 2013). Peptidlerin biyolojik aktivitesi, amino asit dizisi, yapısı, konfigürasyonu ve moleküler ağırlığı ile belirlenmektedir. Triptofan, tirozin, histidin, prolinden oluşan peptidler güçlü antioksidan aktivitesi göstermektedir. Peptid yapısında bulunan lösin ve valin gibi hidrofobik amino

asitler, peptidlerin antioksidan aktivitelerini ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneklerini etkilemektedir. Kazeinler, fosforlanmış serin kalıntıları içeren polar alanlara sahiptir ve -SerP-SerP-SerP-Glu-Glu karakteristik dizileriyle kalsiyum, demir ve çinko ile kompleksler oluşturan etkili katyon şelatörleri olarak antioksidan etkisi gösterirler (El-Sayed & Awad, 2019).

Hidroliz muamelesi, kazeinin yapısındaki bivalent katyonları bağlayan, taşıyan ve biyoyararlanımı artıran ve reaktif oksijen kaynaklarını ortadan kaldıran b-kazomorfinlerin ve kazein fosfopeptidlerin oluşumunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar; β-kazomorfinlerin ve kazein fosfopeptidlerin Caco-2 hücre hattında lipid peroksidasyonun neden olduğu hasarı en aza indirme ve hidrojen peroksite karşı koruyucu etkiler gösterme yeteneklerini ortaya koymaktadır. Bunun yanısıra, kazein fosfopeptidlerinin glutatyon (GSH) seviyelerini artırarak, katalaz aktivitesini indükleyerek ve hücre döngüsünü düzenleyerek hücre canlılığını arttırdığı da bilinmektedir. Kazein fosfopeptidler metalleri şelatladıkları için lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu bir mekanizma sağlamaktadırlar (García-Nebot vd., 2011; Bielecka vd., 2022).

Peynir altı suyu proteininin antioksidan aktivitesi ise yapıdaki histidin ve diğer hidrofobik amino asitlerin içeriğine bağlı olarak şekillenmektedir. Amino asitlerin bileşimiyle birlikte protein içeriği, hidroliz derecesi ve denatürasyon da antioksidan mekanizmasını etkileyen diğer faktörlerdir. Peynir altı suyu proteinleri ortamdaki serbest radikalleri temizler, metalleri şelatlar ve proteinlerdeki SH tiyol gruplarını geri kazanılmasını sağlamaktadır. Peynir altı suyu proteini hidroliziyle yüksek antioksidan kapasitesi gösteren peptidler aktif hale gelmektedir (Power vd., 2013).

Peynir altı suyunda bulunan laktoferrin, demiri şelatlayarak biyoyararlanımının artmasını ve prooksidan etkilerinin inhibe edilmesini sağlamaktadır. Laktoferrin, enflamatuar etkisi ile zararlı hücrelerin in vitro sito toksisitesini arttırmakta ve iltihaplanma bölgelerinde lökositler tarafından reaktif oksijen salınımını inhibe etmektedir. Demir ile bağlanan laktoferrinin doyma derecesine bağlı olarak antioksidan kapasitesi azalma göstermektedir (Cutone vd., 2020). β-laktoglobulinin güçlü antioksidan aktivitesi yüksek miktarda kükürt içeren aminoasit içeriğiyle, özellikle de Cys-121'le açıklanabilmektedir (Bielecka vd., 2022).

Peynir altı suyu fraksiyonlarından olan β-laktoglobulin, çiğ sütün toplam antioksidan kapasitesinin yaklaşık %50'sinden sorumludur. β-Laktoglobulin, proteinlerin alerjenik potansiyelini ve ince bağırsaktaki oksidasyonunu azaltmaktadır. β-Laktoglobulin diğer bir etki mekanizması ise antioksidan kapasitesini artıran A vitamini ve polifenoller dahil olmak üzere çeşitli hidrofobik molekülleri bağlamasından ileri gelmektedir (Belatik vd., 2012; Wu vd., 2018; Li vd., 2019). Hidroliz prosesi ile β-laktoglobulinden salınan peptidlerin serbest radikalleri temizleme yeteneğine bulunmaktadır. Bunlardan biri, yüksek triptofan, tirozin ve metiyonin içeriğine sahip β-LG f (19e29)'dir ve bütillenmiş hidroksi anisolden daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir (Hernández-Ledesma vd., 2005).

Yapısında bir sülfidril grubu bulunduran kükürt içeren amino asitler; protein yapısının ve hücresel bütünlüğün belirlenmesinde, redoks tepkimelerinin, reaktif oksijen kaynaklarının ve ksenobiyotiklerin ortadan kaldırılmasından sorumludur. Neredeyse bütün reaktif oksijen kaynaklarına duyarlı olan metiyonin ve sistein, S-adenosilmetionin, hidrojen sülfit, taurin ve glutatyonun öncüleri olarak etkinlik göstermektedir. Bu yapılar oksidatif stresi azaltarak dokuları hasara karşı korunmasını sağlamaktadır (Bin vd., 2017). Yapılan in vito antioksidan kapasite analizleri metiyonin, sistein ve taurinin sisteinin; metalleri (Fe2+ hariç) şelatlamada, FRAP ve H_2O_2 radikallerini yakalamada, DPPH, ABTS ve O_2- radikallerini indirgemede en etkili mekanizmalar olduğunu göstermiştir. Bu aktif bileşenlerin herbiri farklı antioksidan radikalleri üzerinde etkinlik sağlamaktadır (Bielecka vd., 2022). Örneğin metiyonin ve taurinin, DPPH veya ABTS radikallerini süpürmede etki göstermemektedir (J. H. Kim vd., 2020). Reaktif oksijen kaynaklı değişiklikler, amino asit yan zincirlerindeki proteinlerin yapısında ve biyolojik fonksiyonlarında farklılıklar meydana getirmektedir. Sistein oksitlenmiş formunda, doğal protein konformasyonunu stabilize eden disülfit bağları oluşturmaktadır.

Peynir altı suyu proteini, antioksidan glutatyonun öncüsüdür ve stres faktörlerinin olumsuz etkilerini baskılayarak antioksidan aktivite sergilemektedir. Peynir altı suyu proteinlerinden biyoaktif peptidlerin salınmasının hücre içi glutatyon seviyesini yükselttiği ve *in vitro* interlökin IL-8 (solunum yolunda patogenezden sorumlu sitokin) üretimini azalttığı gösterilmiştir (Piccolomini vd., 2012). Bir ay boyunca uygulanan peynir altı suyu (20 g/gün) takviyesinin, kistik fibrozlu hastalarda C-reaktif protein serum seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Alkalaz enzimlerinden üretilen peynir altı suyu proteini hidrolizatları işleminin iki peptid fragmanı, P4 ve P4c (Val-His-Leu-Lys-Pro'nun

amino dizisini içeren bir pentapeptid) içerdiği tespit edilmiştir. Bu peptidler, insan akciğer fibroblastı MRC-5 hücrelerine hidrojen peroksit maruziyetini önemli ölçüde azaltarak antioksidan aktivite sergilemişlerdir (Kong vd., 2012). Başka bir çalışmada ise, antioksidanlar ve peynir altı suyu peptidleri ile formüle edilmiş bir diyet sıçanlarda anti-inflamatuar aktivite açısından test edilmiştir. Bu diyeti alan farelerin, kontrol grubuyla (%55) beslenen farelere göre daha yüksek hayatta (%90) kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, yüksek süperoksit dismutaz aktivitesi (süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülmesi) ve diyet grubunda daha az patolojik lezyon olmasından kaynaklanmıştır.

Kishta vd. (2013), peynir altı suyu proteininin akciğer enfeksiyonunu azaltmadaki etkisini incelemişler ve basınç ile hidrolize edilen peynir altı suyu proteini diyeti ile beslenen farelerin oksidatif stres, iltihaplanma ve akciğer hasarı seviyelerinde azalma gösterdiğini belirlemişlerdir. Peynir altı suyu proteini hidrolizatları, parasetamole bağlı hepato-nefrotoksisiteye sahip farelere uygulandığında katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesini arttırdığını gözlemlemişlerdir (Athira vd., 2013). Kimotripsin ile hidrolize edilmiş peynir altı suyu proteininden üretilen peptidin peynir altı suyu proteini izolatlarına kıyasla daha yüksek bir demirli şelatlama kapasitesi ve DPPH radikal yakalama aktivitesi sergilediği de tespit edilmiştir.

Aynı zamanda, süt proteini hidrolizi ile çok sayıda antimikrobiyal peptid açığa çıkmaktadır. Peptidlerin antimikrobiyal aktivitesi, bağlı katyonlara (arginin, lizin ve histidin açısından zengin peptidler) ve hidrofobik amino asitlerin bileşimine bağlıdır. Katyonik peptidler, bakteriyel hücre zarlarının negatif yüklü yüzeyleri ile elektrostatik etkileşime girer ve onların kararsız hale gelmesini sağlamaktadırlar. Ayrıca yüksek hidrofobik karakterli peptidler hücre zarlarının lipit tabakasına çok daha kolay nüfus edebilmektedir (Hou vd., 2018; Bielecka vd., 2022).

2.7.2 Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), doymuş yağ asitleri, trans yağlar, yüksek tuz ve yetersiz meyve ve sebze tüketimi gibi sağlıksız diyetlerle ilişkilendirilmektedir (Mendis, 2017). Geçmişteki bazı çalışmalar kardiyovasküler hastalıkların bir kısmını tam yağlı süt ürünleri ile ilişkilendirilmiş olsa da daha güncel çalışmalar süt, peynir ve yoğurt dahil olmak üzere tam yağlı süt ürünleri tüketiminin KVH insidansı ile ilişkili nasıl ters yönde etkili olabileceğini göstermiştir (Lee vd., 2018). Bu çalışmalar ayrıca, bu gıdalarda ve

bunların hidrolizatlarında bulunan biyoaktif peptidlerin KVH azaltmaya katkıda bulunabileceğini de ifade etmektedir. Ryan vd. (2011)'na göre, antihipertansif aktivite, süt biyoaktif peptidlerinin en yaygın olarak bildirilen özelliklerinden biridir. Süt proteinlerinden elde edilen peptidler insanlarda ve hayvanlarda kan basıncını etkilemektedir. Farklı proteolitik eznimlerce parçalanan proteinlerden aktif hale gelen bu peptidler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu (ACE inhibisyonu) etkileri ile kan basıncında düşüş sağlamaktadır.

Süt protein hidrolizatlarından elde edilen biyoaktif peptidler, antihipertansif özelliklerine bağlı olarak yeni gıda ürünlerinin formülasyonunda da geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Ong & Shah (2008) çalışmalarında, peynir starter kültürüne *Lactobacillus acidophilus*'un (LAFTI L®10) eklenmesinin κ-kazein (f 96–102), αs1-kazein (f 1–9), αs-kazein (f 1–7), αs1-kazein (f 1–7), αs1-kazein (f 24–32) ve β-kazein (f 193–209) üretimini nasıl artırdığını açıklamışlardır. Tüm bu biyoaktif peptidlerin, ACE'yi inhibe ederek arteriyel basıncı düşürmeye katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Sahingil vd. (2014), beyaz salamura peynirde starter kültür olarak *Lactobacillus helveticus*'u kullanarak ACE inhibe edici özelliklere sahip biyoaktif peptidlerin arttırılmasını sağlamışlardır. Pihlanto-Leppälä (2000) peynir altı suyundan elde edilen peptidlerin anjiyotensin I dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Pek çok peynir altı suyu proteininden türetilen peptidin ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Peynir altı suyu proteininin nötraz enzim ile hidrolizi, güçlü antihipertansif veya ACE inhibisyon aktivitesi sergilediği gösterilen bir peptid karışımı üretilmiştir. ACE, çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinden sorumludur ve kardiyovasküler bozukluklarla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle peynir altı suyu proteinlerinin ACE enzimini inhibe etmedeki rolü önemlidir. ACE inhibitörü biyoaktif peptidler genellikle 1 kDa'nın altındadır ve peynir altı suyu proteini hidrolizatındaki toplam protein içeriğinin %38'ini oluşturmaktadır (Estévez vd., 2012).

2.7.3 Antidiyabetik Aktivite

Diyabet dünya çapında yaklaşık 400 milyon kişiyi etkileyen kronik bir hastalıktır (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Diyabet, görme kaybı, anjiyopati ve kan akışı kısıtlaması gibi çeşitli bozukluklara neden olan, doku hipoksisine ve iyileşmesi azalmış ülserlere yol açan kritik sağlık sorunlarından biridir. Bu hastalık, ya insülin salgılayan pankreatik beta

hücrelerinin otoimmün yıkımının bir sonucu olarak (tip 1 diyabet) ya da periferik organlardaki insülin direncinin bir sonucu olarak, düzensiz insülin sekresyonuna ve sonunda beta hücrelerinin başarısızlığına (tip 2 diyabet) neden olmaktadır (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Pasin & Comerford (2015)'e göre, süt gıdalarının insülin sekresyonu ve glisemik kontrol üzerindeki sağlıklı halin devamını sağlayan etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler; insülin sekresyonunu uyaran yüksek miktarda esansiyel amino asitler ve biyoaktif peptidlerden, bu makro- mikro besinlerin spesifik kombinasyonlarından ve peynir ve yoğurtta bulunan benzersiz probiyotik ve biyoaktif peptidlerden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmalara göre spesifik peptidler (β-CN f70–77; LPQNIPPL), insülinin düzenlenmesinde anahtar bir enzim olan dipeptidil peptidaz 4'ü (DPP-4) inhibe edebilmektedir (Ahren vd., 2004). Peynir altı suyu protein ve hidrlizat tüketiminin DPP-4'ü inhibe ettiği ve dolayısıyla insülin sekresyonunu tehlikeye atan bireylerde yararlı bir etkiye sahip olabilecek insülin sekresyonunu uyardığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar, VAGTWY ve LPQNIPP gibi biyoaktif peptidler açısından zengin olan süt hidrolizatlarının, diyabet hastalarında glisemik seviyelerin ve insülin sekresyonunun kontrolüne yardımcı olmak için kullanılabileceğini göstermiştir (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Peynir altı suyu proteini türevlerinin (izolat ve hidrolizat), yağ açısından zengin bir diyetle desteklendiğinde, insülin salgılanmasını iyileştirdiği ve tip 2 diyabet hastalarında postprandial trigliserit yanıtlarının düşmesine yol açtığı bulunmuştur. Lösin içeriğince zengin peynir altı suyu proteini hidrolizatıyla bir ay beslenen sıçanlarda insülin seviyesinde bir artış gözlenmiştir (Toedebusch vd., 2012). Sonuçlar, peynir altı suyu proteininin bağırsakta metabolize edildiğini ve bağırsak ve mide hormonlarının salgılanmasıyla birlikte insülin seviyesinin indüklenmesinden sorumlu olan peptidler ve amino asitlerin salındığını kanıtlamıştır. Peynir altı suyu proteininin glikoz konsantrasyonunu azaltmak için etkisi araştırılmış ve proteinin plazma glikozunun insülin ve C-peptid seviyelerinde güçlü bir azaltma etkisi sağladığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, yemekten önce peynir altı suyu proteini tüketiminin hem insüline bağımlı hem de insülinden bağımsız yollarla yemek sonrası glisemiyi azaltabilen GLP-1 ve PYY düzeylerini artırmıştır (Akhavan vd., 2014). Tong vd., (2014) çalışmalarında hem peynir altı suyu proteininin hem de hidrolizat fraksiyonunun sıçan deneklerde insülin direncini iyileştirerek antidiyabetik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.7.4 Antikanser

Peynir altı suyu proteini hidrolizatlarının diğer peynir altı suyu proteini formlarına kıyasla gelişmiş bir antikanser etkisi sağlamaktadır (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Attaallah vd., (2012) çalışmalarında, hidrolize edilmemiş peynir altı suyu proteini ile beslenen kontrol grubuna ait farelere kıyasla, peynir altı suyu proteini hidrolizatı ile beslenen kolon kanserli farelerin makroskobik ve mikroskobik tümörlerin görünümünde bir azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir. Başka bir çalışma, peynir altı suyu proteini hidrolizatın oksidatif hasara sahip sıçan feokromositoma PC 12 hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini göstermiş ve 100-400 µg hidrolizat/mL'lik bir dozaj seviyesinde hücre canlılığında %20-30'luk bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir (Zhang vd., 2012). Birçok araştırma, peynir altı suyundan elde edilen biyoaktif peptidlerin kanserli hastalar için faydalı olabileceğini öne sürmektedir. Castro vd., (2009), kaspaz-3 ekspresyonunun, peynir altı suyu proteini izolatı içeren ortamlarda büyüdüğünü gözlemlemişlerdir. Bu kaspazlar, tipik morfolojik değişikliklere yol açan hücre iskeleti proteinleri gibi anahtar hücresel proteinlerin bölünmesinden sorumludur. Bu nedenle peynir altı suyu ürünlerinin tüketiminin kaspaz-3 ekspresyonunu artırabileceği ve organizmanın tümör oluşumuna karşı korunmasına katkıda bulunabileceği öngörülmektedir (Zhao vd., 2018). Ancak, yalnızca *in vitro* deneylerine dayanan bu bulguların *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir. β-kazomorfinler, sığır β-kazein hidrolizatlarından saflaştırılan opioid benzeri peptidlerdir. Prolinin varlığı, bu biyoaktif peptidlere yüksek proteolitik direnç kazandırırlarr, böylece bozunmadan mideyi kadar ulaşabilirler. β-kazomorfinlerin yanı sıra κ-kasesidinin, malign hücrelere (lösemik hücreler, melanom hücreleri, insan meme kanseri hücreleri) karşı sitotoksisiteyi indükleyebilmeleri nedeniyle, *in vitro* çalışmalarda antitümöral özelliklere sahip oldukları açıklanmıştır (Sah vd., 2015). Bu opioid benzeri peptidler, bağırsak-kan bariyerini geçerek hedef bölgelerine erişebilirler. Tidona vd. (2009) tarafından gösterildiği gibi β-kazomorfin ve κ-kaseidin içeren yoğurt örneklerinin tüketimi tümör hücreleri üzerine stotoksik etki sağlamışlardır.

Tablo 2.3 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı fonksiyonel özellikleri

Protein kaynağı	Kullanılan enzim	Hidroliz derecesi	Molekül boyutu	Sıcaklık-süre parametreleri	Modifiye edilen fonksiyonel özellikler	Referanslar
Süt protein kansantesi	Tripsin Kimotripsin		1-10 kDa	pH 8,0/45°C/120 dk.	Molekül ağırlığı <6 kDa olan süt peptidleri daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir.	Pan vd., (2009)
Süt protein kansantesi	Validaz Nötral protez Alkali proteaz	%35 %27,9 %30,7	1-10 kDa	pH 7,0/55°C/6 sa.	En yüksek aktivite validaz enzimi hidrolizatlarının 3-10 ve 1-3 kDa molekül ağırlığındaki fraksiyonlarında tespit edilmiştir.	Hogan vd., (2009)
Süt protein kansantesi	Allkalaz-Flavourzyme Alkalaz-protemaks Alkalaz-protemaks Alkalaz-proteaz	%15,49 %20,41 %13,09 %18,73	<0,3-0.5 kDa, 0,5-1 kDa, 1-3 kDa ve > 3 kDa	pH 8,5/55°C/2 sa. pH 7,0/50°C/2 sa. pH 6,5/50°C/2 sa. pH 7,0/50°C/2 sa. pH 7,0/50°C/2 sa.	Alkalaz-proteaz ve alkalaz-proteax kombinasyonları en güçlü antioksidan etkisini sağlamıştır.	Cui vd., (2022)
Kazein	Tripsin		0,3-5 kDa	pH 7,8/25°C/24-28 sa.	Amino asit dizisi ile antioksidan kapasite ve etkinlik arasında bir yapı-fonksiyon ilişkisi olduğu belirlenmiştir.	Rival vd., (2001)
Kazein	Tripsin		<10 kDa	pH 8,0/50°C/2 sa.	Kazein hidrolizatları ve küçük molekül ağırlıklı kazein hidrolizatları kazeinden daha iyi antioksidan aktiviteler göstermiştir.	Díaz & Decker (2004)
Kazein	Pepsin Tripsin *α*-kimotripsin *β*-kimotripsin		Cp1;99–109 α_{S1}-kazein Cp;2183–207 α_{S2}-kazein	pH 7,5/37°C/4 sa.	Hidrolizatlardaki antimikrobiyel peptidler tanımlanmıştır. Cp2, cp1'e kıyasla gram negatif bakterilere karşı büyük inhibisyon etkisi sağlamıştır.	McCann vd., (2006)

Tablo 2.3 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı fonksiyonel özellikleri (devamı)

Sodyum kazeinat	Papain Pankreatin Tripsin			pH 7,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk. pH 8,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk. pH 8,0/37°C/10,30,60,240,1440 dk.	DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, indirgeme gücü ve linoleik asit otooksidasyonunun inhibisyonu, hidrolizden sonra önemli ölçüde artarken, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibe edici aktivite, hidrolize tabi tutulmayan sodyum kazeinatlarınkinden 9 kat kadar fazla iyileştirilmiştir.	Luo vd., (2014)
Peynir altı suyu proteini	Kimotripsin Tripsin Proteinaz K Termolisin		3-5-10 kDa	pH 7,8/37°C/5 sa.	Enzim türüne bağlı değişmekle birlikte en yüksek antioksidan aktivitesi 5kDa olan hidrolizatlarda tespit edilmiştir.	Salami vd., (2010)
Peynir altı suyu protein izolatı	Alkalaz Flavuorzyme Nötraz Protemaks	%11,3 %35,2 %5,6 %6,1		pH 8,0/45°C/3 sa. pH 7,0/45°C/3 sa. pH 7,0/45°C/3 sa. pH 6,0/45°C/3 sa.	En yüksek antioksidan kapasitesi; Abts için alkalaz, Troloks için nötraz, alfatokoferol için ise alkalaz hidrolizatlarında tespit edilmiştir.	Dryáková vd., (2010)
Peynir altı suyu protein izolatı	Alkalaz	%19,3- %38,5		pH 8,5/65°C/1, 2, 3, 4, 5 ve 8 sa.	Hidrolizatların antioksidan aktivitesi 5 sa.'lik hidroliz boyunca artmasına karşın, 8 sa.'lik hidroliz ile azalma göstermiştir.	Peng vd., (2010)
Süt protein konsantresi	Papain Ttripsin		<10 kDa	pH 7,8/37°C/4 sa.	Süt proteini hidrolizatları, serumdaki hemolizin seviyesini ve makrofajların fagositozunu artırarak farelerde bağışıklığı uyarmıştır.	Pan vd., (2013)
Peynir altı suyu protein izolatı	Tripsin Kimotripsin	%10	<10 kDa	42°C/ %10 hidroliz derecesine ulaşana kadar geçen süre	Peptidlerinin sağlıklı farelerde bağışıklık parametrelerini modüle ederken, temel peptid fraksiyonları enfeksiyon sırasında bağışıklığı artırmıştır.	Saint-Sauveur vd., (2009)
Peynir altı suyu proteini	Alkalaz	%10-%18		pH 8,0/50°C/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 sa.	Farelerde splenosit proliferasyon aktivitesi önemli ölçüde geliştirmiştir. Bağışıklık sistemini regüle edici etkiyi artırmıştır.	Ma vd., (2012; 2014)
Peynir altı suyu proteini	Tripsin	%9,5		pH 8,0/42°C/ 4 sa.	Hidroliz işlemi *in vivo* testlerinde WPC'nin immünojenisitesi azaltmıştır.	Duan vd., (2014)

Tablo 2.3 Çeşitli enzimlerle hidrolize edilmiş süt proteinlerinin bazı fonksiyonel özellikleri (devamı)

Peynir altı suyu protein konsantresi	Pronaz Kimotripsin-pronaz Papain-pronaz Pepsin-pronaz			pH 6,5/40°C/ 7sa. pH 7,5/40°C/ 2sa. pH 6,5/40°C/ 5sa. pH 6,5/37°C/ 2sa. pH 6,5/40°C/ 5sa. pH 2,0/37°C/ 2sa. pH 6,5/40°C/ 5sa.	Fenilketanuri hastaları için düşük fenilalanin içerikli peptidlerinin üretilmesi sağlanmıştır.	Arai vd., (1986)
Peynir altı suyu proteini	Kimotripsin Karboksipeptidaz A	%15,3 %12,4		pH 8,0/55°C/ 5sa.	Fenilketonuri hastaları için düşük fenilalanin içerikli hidrolizat üretilmesi sağlanmıştır.	Cabrera-Padilla vd., (2009)
Peynir altı suyu protein izolat	Korolaz PP	%10		pH 8,0/50°C/ 5sa.	1 kDa molekül ağırlığındaki hidrolizatların ACE inhibedici etkisi ~%52 oranında zenginleştirmiştir.	O'Loughlin vd., (2014)
α-laktalbumin ve β-laktoglobulin	Pepsin Tripsin Kimotripsin Pankreatin Karboksipeptidaz		1 kDa 30 kDa	pH 8,0/50°C pH 2,0/50°C	< kDa olan fraksiyonların ACE inhibisyonu için IC_{50} değerlerinin 1-30 kDa olan fraksiyolara göre çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir.	Pihlanto-Leppälä (2000)
Peynir altı suyu	Flavourzyme	%3,51-4,98 %7,30-9,54 %13,92-16,46	<10 kDa	pH 7,0/50°C/30 dk.	Daha fazla sayıda daha küçük biyoaktif peptidler ve indirgenmiş laktoz ve türevleri içeren, peynir altı suyu üretimi gerçekleştirilmiştir.	Ghosh vd., (2017)

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal ve Kimyasallar

Protein hidrolizatları üretiminde ana materyal olarak kulllanılan kazein Enka Süt (Adana, Türkiye), süt serum proteini Yeşilmarka (Tekirdağ, Türkiye), protein ise Milkon (İstanbul, Türkiye) firmalarından temin edilmiştir. Hidrolizat eldesi için kullanılan savinaz (protease from *Bacillus* sp., 16 U/g), flavourzyme (P6110, from *Aspergillus oryzae*, 500 U/g), alkalaz CLEA (30,079, 5 U/g) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) firmasından, subtilisin (E-BSPRT from *Bacillus licheniformis*, 10,000 U/g) ise Megazyme (Wicklow, Ireland) firmasından satın alınmıştır. Antioksidan kapasitelerinin tespitinde kullanılan 3-(2- piridil)-5,6-difenil1,2,4- triazin-4',4'-disülfonik asit sodyum tuzu(ferrozin), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 2,2'- azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) kimyasallarının yanısıra 1-anilino-8 naftalinsülfonat (ANS), NaOH, HCl, posfat buffer tuzu (PBS), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dulbecco modifiye edilmiş Eagle's ortamı (DMEM), Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Sitotoksisite analizlerinde kullanılan insan kanser hücrelerinden kolorektal Caco-2(ATCC, #HTB-37) ve pankreas MIA PaCa-2 (ATCC, CRL-1420) hücre hatları ve sağlıklı olarak kullanılan insan embriyonik böbrek HEK-293 (ATCC, CRL-1573) hücre hattı Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan sağlanmıştır. Bütün analizlerde kullanılan tüm kimyasal ve solventler analitik saflıktadır.

3.2 Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi

Kazien, süt serum proteini ve süt protein fraksiyonlarının enzimatik hidrolizi için öncelikle kullanılacak enzimlerin optimum çalışma koşulları (pH-sıcaklık normları) ön denemelerle Tablo 1'de gösterildiği gibi belirlenmiştir. Çalışma öncesi her bir protein fraksiyonunun protein konsantrasyonu tespit edilmiştir. %5 (a:h) protein içerecek şekilde hazırlanmış protein süspansiyonları 1 sa. süre ile 250 rpm hızında oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Proteinlerin suyu yapıya alarak tamamen hidratlanabilmesini sağlamak için karışımlar 4°C'de 12 sa. boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda protein çözeltileri kullanılacak enzim türüne bağlı olarak optimum sıcaklık ve pH değerlerine

ayarlanmıştır (Tablo 3.1). Enzim-substrat oranı 3:100 (a:a) olacak şekilde enzim ilavesi gerçekleştirilen protein çözeltileri 270 dakika (dk.) boyunca hidrolize edilmiştir. Hidroliz muamelesi sonrası enzim inaktivasyonunu gerçekleştirmek için hidrolizat süspansiyonları 95°C'ye ayarlı su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir. Ardından süspansiyonlar 4°C'de 15,000 rpm hızında 30 dk. süreyle santrifüj edilmiştir. Pellet kısımları uzaklaştırılan hidrolizat çözeltileri -80°C'de 24 sa. dondurulmuş ve ardından Martin Christ GmbH (Beta 1-8 LSCplus, Almanya) marka kurutucuda dondurularak kurutulmuş ve toz formuna getirilmiştir. Numuneler, analizler yapılana kadar 4°C'de buzdolabında hava almayacak şekilde saklanmıştır.

Tablo 3.1 Enzimatik hidrolizde kullanılan enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerleri

Enzim çeşidi	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)
Flavourzyme	7	50 °C
Alkalaz	8	60 °C
Subtilisin	7,5	60 °C
Savinaz	9	50 °C

3.3 Hidroliz Derecesinin (%) Belirlenmesi

Örneklerin hidroliz derecesi pH stat yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Adler-Nissen, 1986). pH- stat yöntemi, proteinlerin hidroliz sürecinde parçalanmasıyla ortaya çıkan hidrojen iyonlarına bağlı olarak pH değerinin sabit tutulması ile uygulanan bir metottur. Bu yöntem, hidrolizin etkisiyle serbest forma dönüşen proteinlerin ototitrasyonunda ortama eklenen baz miktarının ölçülmesiyle hidroliz derecesinin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Enzimatik hidroliz prosesinin 15. dk., 30. dk., 45. dk., 60. dk., 90. dk., 120. dk., 150. dk., 180. dk., 210. dk., 240. dk., ve 270. dk.'larında çözeltilerin pH değerleri ölçülmüş ve her bir enzim çeşidi için optimim pH'da sabit tutmak için harcanan baz miktarları belirlenmiştir. Titrasyon işleminde pH ölçümleri pH metre (Mettler Toledo, S210, ABD) ile gerçekleştirilmiş, optimum pH'ları sabit tutmak için baz olarak 0,1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Parçalanma derecesi olarak da ifade edilen hidroliz derecesi, parçalanan peptid bağlarının (h) birim ağırlık başına toplam bağ sayısına (h_{tot})

olan oranı olarak tanımlanmaktadır. Hidroliz dereceleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$HD(\%) = \frac{hx100}{h_{tot}} = \frac{VxNx100}{\alpha xMxh_{tot}} \quad (3.1)$$

HD: Hidroliz derecesi

h: Parçalanan peptid bağları sayısı

h_{tot}: Toplam peptid bağ sayısı (meqv/g protein)

V: Titrasyonda harcanan baz miktarı (mL)

N: Titrasyon için kullanılan bazın normalitesi (0,1N)

M: Çözeltideki protein miktarı (g)

3.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid (SDS-PAGE) Jel Elektroforez Analizi

Örneklerin molekül ağırlığına göre sıralanmasını gözlemleyebilmek için yapılan SDS-PAGE analizi (Laemmli, 1970) tarafından belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Farklı fraksiyonlardaki süt proteinleri ve hidrolizatlar numuneleri, 10 mg/mL konsantrasyonda saf su içinde çözündürülerek örnek tamponu (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, gliserol, %10 SDS, w/v, %0,5 bromofenol mavisi, β-merkaptoetanol) ile 1:1 hacim oranı olacak şekilde karıştırılmıştır. Ardından, 95 °C'de kaynayan su banyosunda 5 dakika süre ile bekletilerek örnekler hazır hale getirilmiştir. Örneklerin molekül büyüklüğüne göre hazırlanan %7,5-12,5 gradyan poliakrilamid yürütme jeli (a/h) ve %4 yükleme jelleri (a/h) hazırlanarak elektrolit tamponu (25 mM Tris, %0,1 SDS, 192 mM glisin) ile doldurulan dikey elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Her bir yükleme kuyucuğuna 20 µL örnek mikro şırınga ile yüklendikten sonra peptid ve proteinlerin jel boyunca hareketini sağlamak için, 20 mA/jel sabit akımda dikey elektroforez sistemi (Mini-Protean®System, Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Inc, ABD) çalıştırılmıştır. Yaklaşık 45 dk. sonra örneklerin bant boyunca yürümesi tamamlandıktan sonra elektroforez sistemi durdurulmuş ve üniteden çıkarılan jeller %0,25 (a/h) Coomassie Brilliant Blue içerisinde bekletilerek bantların boyanması sağlanmıştır.

Fazla boyayı gidermek için yıkama çözeltisi (su/metanol/asetik asit: 4/5/1, (h/h/h)) içerisinde bekletilen jeller bir jel görüntüleme sistemi (Biorad Gel Doc EZ, Bio-Rad Laboratories Inc, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.5 Yağ Bağlama Kapasitesi

Hidrolizatların yağ bağlama kapasiteleri Bencini (1986) tarafından tarif edilen yönteme göre belirlenmiştir. Darası alınmış 1,5 mL'lik ependorf tüplerine protein ve hidrolizat örneklerinden 50 mg tartılmış ve üzerine 1mL mısır yağı eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 sa. bekletilen karışım her 10 dk. bir 30 sn. süre ile vortekslenerek (Weightlab Instruments, Türkiye) yağın örneklere iyice nüfus etmesi sağlanmıştır. Ardından, protein-yağ karışımları 5000 g'de 5 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra, süpernatant yağ kısmı uzaklaştırılarak örneklerin absorbe ettikleri yağın ağırlığı ölçülmüştür. Yağ bağlama analizi, her bir örnek için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve örneklerin bağladığı yağ miktarları aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar g yağ/g protein olarak verilmiştir. Örneklerin bağladığı yağ dışında tüplere yapışan yağın miktarını elimine etmek için boş tüpe yapışan yağ miktarı bütün tartım sonuçlarından çıkarılarak sonuçlar hesaplanmıştır.

$$\text{YBK}\ (g\ yağ/g\ örnek) = \frac{M_{ÖY} - M_{Ö}}{M_{Ö}} \qquad (3.2)$$

YBK: Yağ bağlama kapasitesi (g yağ/g örnek)

$M_{Ö}$: Örnek ağırlığı (g)

$M_{ÖY}$: Santfifüj sonrası süpernatant yağ fazı uzaklaştırıldıktan sonraki örnek ve absorbe ettiği yağ ağırlığı (g)

3.6 Emülsiyon Aktivite ve Stabilite İndeksi

Süt proteinlerinin ve hidrolizatlarının emülsiyon aktiviteleri ve stabilite değerleri Pearce & Kinsella (1978) göre türbidimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. 30 mL protein çözeltisi (1:100, protein: distile su) 10 mL ayçiçek yağı ile karıştırılmış ve IKA Ultra Turrax T25 homojenizatör (Schott Iberica, S.A., İspanya) kullanılarak 10000 rpm'de 90 sn. homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi ile emülsiyon oluşumu sağlandıktan sonra 0. ve 12. dk.'larında emülsiyonların dip kısımlarından alınan 50 µL örnek 5 mL %0,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisiyle karıştırılmıştır.

Daha sonra, çözeltinin absorbansı 500 nm dalga boyuna ayarlı Shimadzu UV-1800 (Tokyo, Japonya) marka UV/VIS spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksleri (ESI) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$T = 2.303 \times \frac{A}{L} \tag{3.3}$$

T: Türbidite

A: Örneklerin 500 nm dalga boyundaki absorbans değerleri

L: Spektrofotometre küvetinin ışık yolu (m)

$$EAI = \frac{2 \times T \times R}{C \times V} \tag{3.4}$$

EAI: Emülsiyon aktivite indeksi

R: Seyreltme faktörü

C: Protein çözeltisindeki birim hacimdeki protein ağırlığı

V: Yağın çözelti içerisindeki hacim fraksiyonu

Örneklerin emülsiyonları 4 °C'de 10 dk. süre ile depolanmış ve 10. dk. absorbansları 520 nm dalga boyunda ölçülmüştür. 0. ve 10. dk. absorbansları arasındaki fark olarak ifade edilen ESI değeri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EAI = \frac{A \times \Delta t}{\Delta A} \tag{3.5}$$

A: 0. dk. emülsiyon absorbansı

ΔA: 0. dk. ve 10. dk. emülsiyon absorbans farkı

Δt: Absorbans ölçümleri arasında geçen süre (10 dk.)

3.7 Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel)

Süt protein fraksiyonları ve hidrolizat örneklerinin yüzey yükleri ölçümleri, dinamik ışık saçılımlı (DIS) zetasizer cihazı (Malvern instruments, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak örnekler, 0,1 M fosfat tamponu (PBS, pH 7)

ile protein konsantrasyonu %0,2 (a/h) olacak karıştırılmış ve daha sonra 2 dk. süre ile vortekslenerek tamamen çözündürülmesi sağlanmıştır. 0,22 μm'lik filtre yardımıyla süzülen dispersiyonlar, katlanmış kapiler hücreli zetasizer küvetine aktarılarak, zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Bütün zeta potansiyeli ölçümleri her bir numune için en az 3 tekrar ve 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8 Yüzey Hidrofobisitesi

Örneklerin yüzey hidrofobisiteleri Aewsiri vd., (2013)'nin tarif ettiği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. İlk olarak 0,1 M fosfat buffer (pH 7,0) kullanılarak örneklerin 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL ve 5 mg/mL olmak üzere 5 farklı derişiminde çözeltileri hazırlanmıştır. Bir cam deney tüpü içerisine hazırlanan her bir çözeltiden 2 mL alınarak 20 μL ANS (8 mM) çözeltisi ile karıştırılmıştır. 370 nm uyarılma ve 485 nm emisyon dalga boyuna ayarlı bir floresan spektrofotometre (Photon Technology International, NJ, ABD) kullanılarak örneklerin farklı konsantrasyonlarına ait absorpsiyon ölçümü gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlere (mg/mL) karşılık gelen absorpsiyon değerlerinin eğimi kullanılarak yüzey hidrofobisite indeksleri hesaplanmıştır.

3.9 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim

1mg/mL olacak şekilde su içerisinde çözündürülerek hazırlanan örneklerin ATR-FTIR spektrumları 500–4500 cm^{-1}'lik bir kızılötesi alanda taranarak incelenmiş ve sonuçlar 4 cm^{-1} çözünürlükte, spektrum başına 16 tarama ile kaydedilmiştir. Spektrum ölçümleri bir DLa TGS dedektörü (Bremen, Almanya) ile donatılmış Bruker Tensor 27 spektrometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekonder bağ yapılarındaki değişiklikler Originlab yazılımı (sürüm 9.0 PRO, OriginLab Corporation, Northampton, MA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1600 ve 1700 cm^{-1} (Amid I) bölgesinde oluşturulan bir lineer taban çizgisi için pik dekonvulasyon uygulanarak α-heliks, β-sheet, β-turn ve rastgele sarmal bağ yapılarındaki değişimler % olarak hesaplanmıştır.

3.10 Antioksidan Aktivite

Örneklerin antioksidan kapasiteleri farklı radikal süpürme mekanizmalarına etki eden ABTS VE FRAP olmak üzere iki farklı metot kullanılarak belirlenmiştir.

3.10.1 ABTS Yöntemi

Örneklerin 2,2′-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radikaline karşı gösterdiği antioksidan radikal süpürme etkisi Re vd. (1999)'nin tarif ettiği yönteme göre belirlenmiştir. 2,45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM'lik ABTS çözeltisi oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 sa. kadar bekletilerek çalışan ABTS+ radikali elde edilmiştir. Analiz öncesi, çalışan ABTS+ radikal çözeltisinin absorbansı 734 nm dalga boyunda 0,700±0,02 olacak şekilde ayarlanmış, her bir hidrolizat ve protein örneği için, en yüksek konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde 6 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerden 100 µL alınarak 2 mL çalışan ABTS radikal çözeltisi ile karıştırılmış ve 37 °C'de 6 dk. süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 734 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 UV/VIS, Tokyo, Japonya) ile örneklerin absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her bir numune için farklı konsantrasyonlara karşı gelen absorbanslar kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğinde ABTS radikali için %50 inhibisyon sağlayan numune miktarları IC_{50}(µg/mL) değerleri olarak ifade edilmiştir.

3.10.2 FRAP Yöntemi

Süt proteinleri ve hidrolizatların FRAP radikalini indirgeme gücü Benzie & Strain (1996)'nin anlattığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Günlük olarak hazırlanan 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 10 mM TPTZ çözeltisi (40 mM HCl içerisinde hazırlanmış) ve 20 mM FeCl3.6H2O çözeltileri sırasıyla 10:1:1 (h/h/h) oranlarında karıştırılarak FRAP reaktifi hazırlanmıştır. Her bir örnek distile su içerisinde çözündürülerek 10 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Bir cam deney tüpü içerisinde 100 µL örnek çözeltisi, 900 µL distile su ve 2mL FRAP reaktif çözeltisi karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dk. süre ile bekletilmiştir. 593 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 UV/VIS, Tokyo, Japonya) ile örneklerin absorbansları ölçülmüştür. Troloks ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak örneklerin FRAP radikalini süpürme gücü mM Troloks eşdeğerliği olarak ifade edilmiştir.

3.11 *In vitro* Antidiyabetik Aktivite

Örneklerin antidiyabetik aktiviteleri, α-amilaz ve α-glukozidaz enzimlerine karşı sağladıkları inhibisyon etkisi ile belirlenmiştir.

3.11.1 α-Glukozidaz İnhibitör Aktivitesi

α-Glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi, Kumar vd. (2013) tarafından tarif edilen yönteme göre belirlenmiştir. 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltilerinden 25 µL alınarak 25 µL α-glukozidaz enzimi (0,5 U/mL) ile 96 kuyucuklu bir mikroplakada karıştırılmıştır 25 °C'de 10 dk. süre ile inkübasyona tabi tutulduktan sonra, enzim-örnek karışımlarına aynı hacimde (25 µL) 0,5 mM para-nitrofenil-α-D-glukopiranozid (P-NPG) substratı eklenerek karışım 37 °C'de 30 dk. tekrar inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 0,2 M sodyum karbonat (100 µL) eklenmiş ve karışımın absorbansı, 405 nm dalga boyuna ayarlı ELX800 plaka okuyucu (Biotek, CA, ABD) ile ölçülmüştür. İnhibisyon yüzdesi, negatif kontroldeki %100 enzim aktivitesine göre hesaplanmıştır. α-Glukozidaz enzimi için örneklerin sağladığı inhibitör aktivitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\alpha - \text{Glukozidaz Enzim İnhibisyonu } (\%) = \frac{A_K - A_{Ö}}{A_K} \times 100 \qquad (3.6)$$

A_K: Örnek içermeyen PBS çözeltisinin absorbansı

$A_{Ö}$: Örnek çözeltilerinin absorbansı

3.11.2 α-Amilaz İnhibitör Aktivitesi

Örneklerin α-amilaz enzimi için sağladığı inhibitör aktivitesini belirlemek için Yu vd. (2011) anlattığı yöntem kullanılmıştır. 96 kuyucuklu bir mikroplaka içerisine farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 50 µL hidrolizat çözeltileri eklenmiş ve üzerine 25 µL α-amilaz çözeltisi (0,5 U/mL, pH 6,9, 6 mM PBS) ilave edilmiştir. 37 °C'de 15 dk. süre ile uygulanan inkübasyon işleminden sonra karışım üzerine pipetaj yapılarak 50 µL %0,5' lik nişasta çözeltisi (20 mM PBS, pH 6,9) eklenmiş ve aynı sıcaklıkta tekrar inkübe edilmiştir. 10dk.'lik bu inkübasyon muamelesinden sonra, %1 3,5-dinitrosalisilik asit ve %12 potasyum sodyum tartarat içeren 600 µL DNS reaktifi ilave edilen karışım 100 °C'de 10 dk. süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, 405 nm dalga boyuna ayarlı ELX800 plaka okuyucu (Biotek, CA, ABD) kullanılarak karışımların absorbans değeri ölçülmüştür. Negatif kontrolün %100 enzim aktivitesine sahip olduğu kabul edilerek göre örneklerin inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır. α-Amilaz enzimi inhibitör aktivitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\alpha - \text{Amilaz Enzim İnhibisyonu } (\%) = \frac{A_K - A_{Ö}}{A_K} \times 100 \quad (3.7)$$

A_K: Örnek içermeyen PBS çözeltisinin absorbansı

$A_Ö$: Örnek çözeltilerinin absorbansı

3.12 *In vitro* Sitotoksik Aktivite

Protein örnekleri ve hidrolizatların farklı hücre hatlarında *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin tespiti MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksite analizleri için; insan kolorektal Caco-2 kanser hücre hattı (ATCC, #HTB-37) ve insan pankreas MIA PaCa-2 (ATCC, CRL-1420) kanser hücre hatları hastalıklı hücre hatları olarak, insan embriyonik böbrek HEK-293 (ATCC, CRL-1573) hücre hattı ise sağlıklı hücre hattı olarak tercih edilmiştir. Sıvı nitrojen içerisinde saklanan hücre hatlarını aktif hale getirmek için ilk olarak 37°C'lik su banyosunda 30 dk. kadar bekletilmiştir. Daha sonra hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 (h/h) L-glutamin ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) içeren Dulbecco' nun modifiye Eagle's besiyerinde (DMEM) 37 °C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilerek geliştirilmiştir. Analiz için gerekli hücre sayısına ulaşılana kadar pasajlama işlemine devam edilerek hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır. 750 µL tripsin EDTA muamelesi ile flasklardan toplanan hücreler tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında sayımı gerçekleştirilmiştir. İstenilen canlı hücre sayısına ulaşıldıktan sonra besiyeri ile seyreltilen hücrelerden 100 µL alınarak $15X10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu bir mikroplakaya konulmuştur. 37°C'de 24 sa. inkübe edilerek hücrelerin kuyucuk tabanına tutunması sağlanmış ve mikroskopta kontrol edildikten sonra kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılmıştır. DMEM besiyerinde çözündürülerek 6 farklı konsantrasyonda (1-1000 µg/mL) hazırlanan örnek çözeltileri 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Negatif kontrol olarak DMEM ortamı kullanılmıştır. Besiyerinden arındırılan her bir kuyucuğa DMEM'li besiyeri ile hazırlanan örnek çözeltilerinden 100 µL eklenmiş aynı sıcaklık-süre normlarında tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekli DMEM besiyeri uzaklaştırılarak 100 µL MTT solüsyonu eklenmiş ve 2 sa. süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, oluşan mavi kristalleri çözmek için her bir kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiş ve 570 nm dalga boyuna ayarlı mikroplaka okuyucuda (Biotek, Elx808IU, ABD)

absorbansların okuması gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki denklem kullanılarak hücre hatlarındaki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre } (\%) = (A_{Ö} - A_K) \times 100 \quad (3.8)$$

A_K: Örnek içermeyen DMEM besiyerinin absorbansı

$A_{Ö}$: DMEM besiyeri ile hazırlanan örnek çözeltilerinin absorbansı

3.13 İstatistiksel Analizler

Bütün analiz sonuçları SPSS Statistics (IBM SPSS version 17,0, Armonk, NY) programı ile tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak %95 güven aralığında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirilmiş ve değişkenler için aritmetik ortalama ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Numuneler arasındaki önemli farklılıklar ANOVA ve Tukey karşılaştırmaları ile belirlenmiştir.

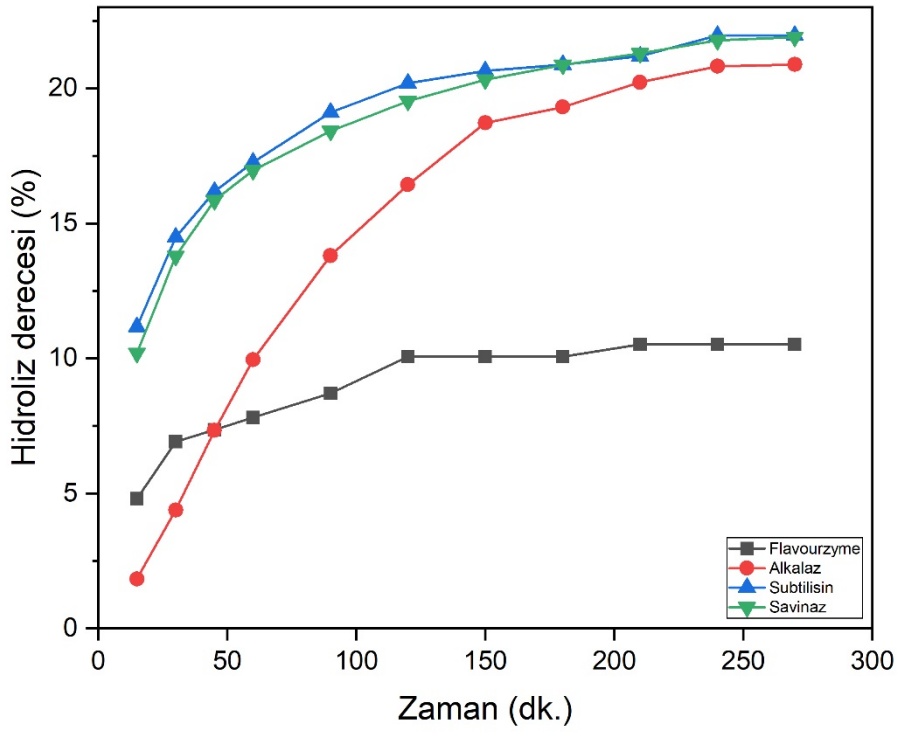
4
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Hidroliz Derecesi (%)

pH- stat yöntemiyle hidroliz derecesinin (HD) belirlenmesinde temel prensip, hidrolizin gerçekleşmesiyle birlikte ortama salınan amino gruplarının bir alkali çözelti ile titre edilmesidir.

Kazein, süt serum proteini (SSP) ve süt protein örnekleri flavourzyme, alkalaz, savinaz ve subtilisin olmak üzere 4 farklı ticari enzim ile hidroliz edilmiştir. Farklı proteazların fraksiyonlarına ayrılmamış olan süt proteininin hidrolizi üzerine olan zamana bağlı etkisi % HD Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Enzim çeşidine göre HD %10,52 ile %21,96 arasında değişim göstermiştir. Hidroliz üzerine en düşük aktiviteyi gösteren flavourzyme hidroliz işleminin ilk sürelerinde %4,81'lik bir parçalanma etkisi meydana getirirken, ilerleyen sürelerde yavaşlayarak hidrolizin 120. dakikasından sonra ise sabit bir parçalanma etkisi göstermiştir. İkinci en düşük parçalanma sağlayan alkalaz ise %20,88 hidroliz derecesine kadar süt proteinini hidroliz etmiştir. Alkalaz enzimi, özellikle hidroliz işleminin ilk 150. dakikasına kadar sürekli artan bir ivme ile hidroliz meydana getirmiştir. Hidrolizin 150-250. dakikalarında ise daha düşük bir artan ivme ile hidroliz işleminde etkinlik göstermiştir. Savinaz (%21,90) ve subtilisin (%21,96) proteazları ise süt proteinin hidrolizinde çok benzer bir etki meydana getirmişlerdir. Hidroliz reaksiyonuna başlama ve devam etme potansiyelleri çok küçük farklılıklar göstermekle birlikte diğer iki enzime kıyasla reaksiyonun ilk sürelerinde yüksek bir parçalanma sağladıkları tespit edilmiştir. Flavourzyme, serin tipi enzimlere göre süt proteininin proteolizi üzerinde çok daha kısıtlı bir etkiye sahip olma eğilimi göstermiştir. Çalışmamızın bulgularına paralel olarak, peynir altı suyunun pankreatin, alkalaz ve flavourzyme ile hidrolize edildiğinde flavourzymein en düşük hidrolizasyonu sağladığı görülmüştür (de la Hoz vd., 2014). Daha fazla ekzopeptidaz karakterine sahip olduğu için çoğunlukla terminal peptid bağlarını etkiler. Öte yandan, çok geniş substrat özgüllüğüne sahip olan savinaz, subtilisin ve alkalaz enzimleri, daha fazla bölünmüş peptidlerin salınmasına neden olarak HD nin artmasına ve moleküler ağırlığın daha fazla düşmesine neden olmuştur. Üretilen

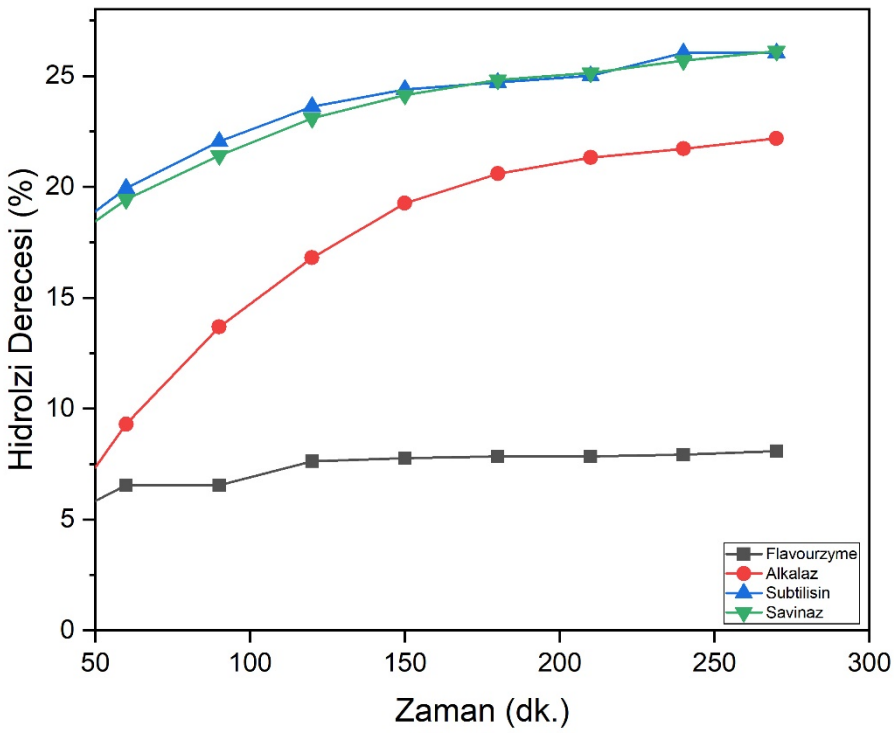
hidrolizatların fonksiyonel, teknolojik, organoleptik ve biyoaktif özelliklerinin %HD (Al-Shamsi vd., 2018) tarafından kontrol edilebileceği bildirilmiştir.



Şekil 4.1 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt protein örneğine ait zamana bağlı % HD değişimi

Kazein örneklerinin farklı enzimlerle parçalanma derecesini gösteren zamana bağlı hidroliz derecesi grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir. % HD'deki artış, muhtemelen proteolizin ilerlemesi ile ortamdaki enzime bağlanacak substrat miktarının azalmasına bağlı olarak zamanla azalmıştır. Kazein için en düşük hidroliz dereceleri %8,08 ve %22,19 ile flavourzyme ve alkalaz enzimiyle üretilen hidrolizatlarda tespit edilmiştir. Flavourzyme hidroliz işlemi boyunca kazeinin parçalanmasında sınırlı bir etkinlik göstermiştir. %3,4 ile başlayan parçalanma 270 dk. sonunda sadece %8,1'lere kadar yükselebilmiştir. Alkalaz enzimi ise sürekli artan bir hidroliz aktivitesi sergileyerek %22,19 hidroliz derecesine sahip hidrolizat üretimi sağlamıştır. Süt proteininde de gözlemlendiği gibi savinaz ve subtilisin proteazlarının parçalanma etkinlikleri paralellik göstermiştir. Subtilisin ve savinaz hidrolizatlatının parçalanma dereceleri sırasıyla %26,03 ve %26,12 olarak hesaplanmıştır. Her iki enzim de hidrolizin ilk süresi olan 15.

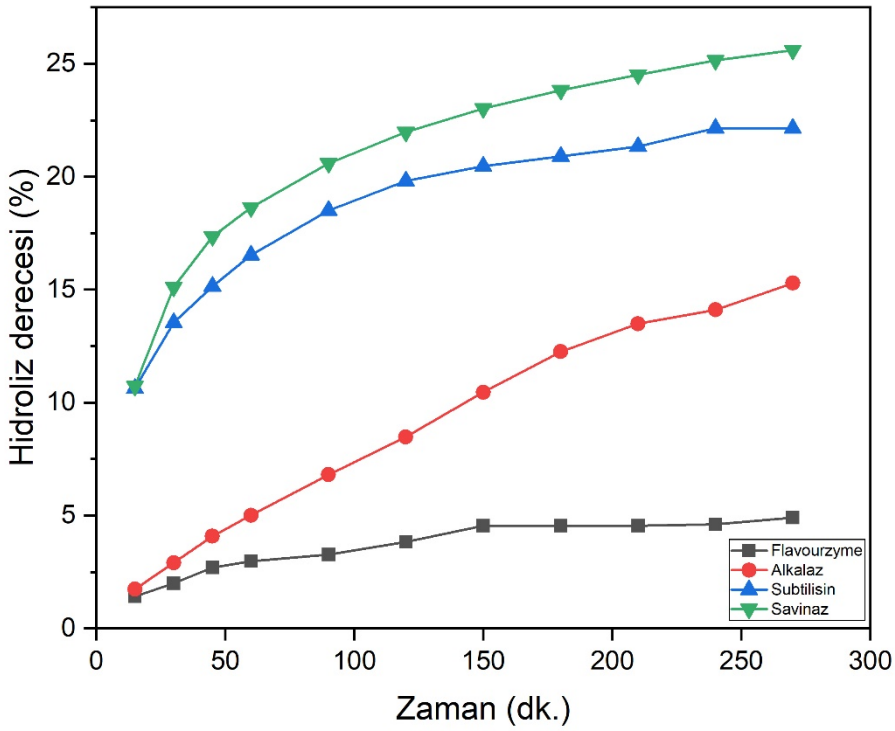
dakikada yaklaşık %11 gibi bir parçalanma sağlarken, alkalaz enzimine kıyasla daha yavaş yükselen bir aktivite sergilemişlerdir. Enzimlerin peptid bağlarını etkileyebildiği mekanizmalar ile % HD arasında yakın bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (Kristoffersen vd., 2020). Buna bağlı olarak enzimler farklı derecelerde parçalanma etkisi göstermektedir. Serin tipi enzimler, substrat bağlama yerlerinde aktif serin kalıntılarını kullanabilirler (Olsen vd., 2004). Çalışmamızda serin ve serin benzeri enzimler grubunda yer alan savinaz, subtilisinve alkalaz enzimleri hidrolizatlarında hidroliz seviyeleri oldukça benzer bulunmuştur. Farklı enzim uygulamalarının farklı süt türlerinin proteinlerinde % HD üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Bao vd., 2016).



Şekil 4.2 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein örneğine ait zamana bağlı % hidroliz derecesi değişimi

Süt serum proteinlerinin zamana bağlı olarak değişen hidroliz dereceleri Şekil 4.3'te gösterildiği gibidir. Flavourzyme diğer iki protein örneğine kıyasla SSP'de çok düşük bir hidroliz etkisi göstermiştir. %1,42 ile başlayan parçalanma işlemi 270 dakikalık hidroliz süresince ancak %4,9'a kadar çıkabilmiştir. Alkalaz enzimi flavourzymeden sonra en

düşük parçalanma aktivitesini göstermesine karşın, hidroliz boyunca lineer bir artış sergilemiştir. Alkalaz enzimi hidroliz süresi boyunca sürekli artan bir parçalanma etkisi meydana getirmiştir. Savinaz SSP'nin hidrolizinde en yüksek HD (%25,61) sağlayan enzim olmuştur. Subtilisin enziminin hidrolitik aktivitesi hidroliz prosesi boyunca devam etmiş ve SSP hidrolizatında %22,14 HD meydana getirmiştir.



Şekil 4.3 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP örneğine ait zamana bağlı % hidroliz derecesi değişimi

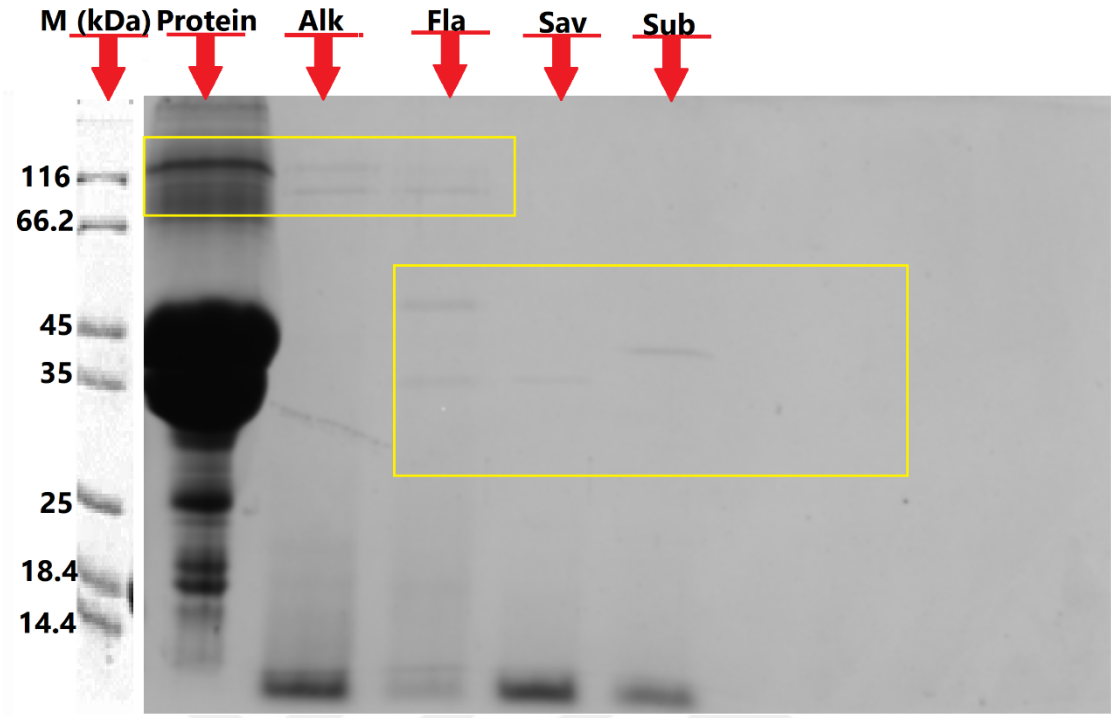
Enzim türlerine bağlı olarak hidroliz dereceleri değerlendirildiğinde enzimlerin bütün süt proteinlerinde benzer aktivite sergiledikleri görülmektedir. Hidroliz derecesinde genel olarak uygulanan hidroliz süresi, optimum pH-sıcaklık normları gibi faktörler etkili olmaktadır. Artan hidroliz süresiyle birlikte örneklerin hidroliz derecelerinde artış gözlemlenmiştir. Polipeptid zincirindeki peptid bağlarının parçalanmasıyla gerçekleşen hidroliz prosesinde en kritik noktalardan biri de şüphesiz ki enzim- substrat ilişkisine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Anahtar kilit mekanizmasıyla ifade edilen bu ilişki, enzimlerin substratın uygun bağlanma bölgelerinde birleşmesiyle gerçekleşmektedir. *Aspergillus oryzae* kaynaklı flavourzyme, nötr veya hafif asit koşullar altında optimum

aktivite göstermektedir. Endopeptidaz ve ekzopeptidaz karışımı yani aminopeptidaz karakterli olduğu için birçok substratta yüksek hidroliz derecelerine sahip hidrolizat üretimine olanak tanımaktadır (Cui vd., 2022). Flavourzyme endoproteazlara kıyasla daha yüksek oranda ekzoproteaz içeren en az beş prostetik grup içermektedir. Flavourzyme'in bu özelliği kazein, SSP ve süt proteinlerinin hepsinde düşük düzeylerde hidroliz etkisi meydana getirmesiyle ilişkilendirebilir. Bir çalışmada süt protein konsantresi ilk olarak alkalaz hidrolizine tabi tutulduktan sonra flavourzyme, proteaks, protameks ve proteaz A 2SD enzimleriyle ikinci bir hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Endoproteaz karakterli olan alkalazla gerçekleştirilen ilk aşamada endopeptidazlar tarafından peptid bağlarının bölünmesi, ekzopeptidazın etki ettiği terminal peptid bölgelerinin sayısını artırmıştır. İkinci hidroliz aşamalarında kullanılan flavourzyme'in peptidleri amino asitlere hidrolize edebilen ekzoproteaz aktivitesi sergileyerek daha yüksek hidroliz derecesi sağladığı gözlemlenmiştir (Cui vd., 2022). Cui vd. (2022) konsante süt proteinlerinin hidrolizi için alkalaz, flavourzyme ve protemaks enzimleri kullanmış ve alkalazın çok daha güçlü bir parçalanma sağladığını bildirmişlerdir. 180 dakikalık hidroliz muamelesinde flavourzyme %11,9'a kadar bir parçalanma sağlarken, alkalaz hidrolizatlarında hidroliz derecesi %15,7 olarak tespit edilmiştir. Subtilisin geniş bir substrat özgünlük profili sergilediği için enzim mühendisliğinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Azrin vd., 2022). Peptid bağını hidrolize etmek için bir Ser tortusu nükleofilinin hidroksil grubunu kullanarak katalizör görevi gören serin proteazları grubunda yer alan savinaz ve subtilisin endoproteinaz karakterli oldukları için süt proteinlerinin hidrolizinde daha fazla aktivite göstermişlerdir. Ayrıca subtilin gibi proteinazlarda ortamdaki kalsiyum iyonlarının varlığı, enzimin olgunlaşma süreci için önemlidir ve kalsiyum iyonlarının subtilisin yapısındaki spesifik bölgelere bağlanmasında enzim alanının açılma aktivasyon stabilitesi artmaktadır. Bundan dolayı da daha yüksek derecelerde parçalanma etkisi sağlamaktadır (Gilliland & Teplyakov, 2011). Alkalaz, subtilin A ve savinaz aromatik ve hidrofobik amino asitlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) C-terminalindeki bağları hidrolize eden alkalin endoproteazlar grubunda yer aldıkları için hidrolizin daha yüksek derecelerde meydana gelmesinde etkili olan diğer bir etken olarak değerlendirilebilir. Daha fazla hidrofilik grubun açığa çıkmasına neden olan alkali pH'daki konformasyonel değişiklikler, bu enzimler tarafından kazein, SSP ve süt protein hidrolizini arttırmış ve dolayısıyla flavourzyme hidrolizatından daha küçük molekül ağırlıklı peptidler meydana gelmiştir. Bunun nedeni,

alkalazın aromatik amino asitler ve hidrofobik amino asitler (Tyr, Trp, Phe ve Leu) gibi protein peptid bağlarını yok etmek için daha fazla katalitik bölgeye sahip derin bir endoproteaz olması olabilir (Shazly vd., 2019)

4.2 Protein ve Hidrolizatların Molekül Ağırlıklarının Değişimi (SDS-Page Analizi)

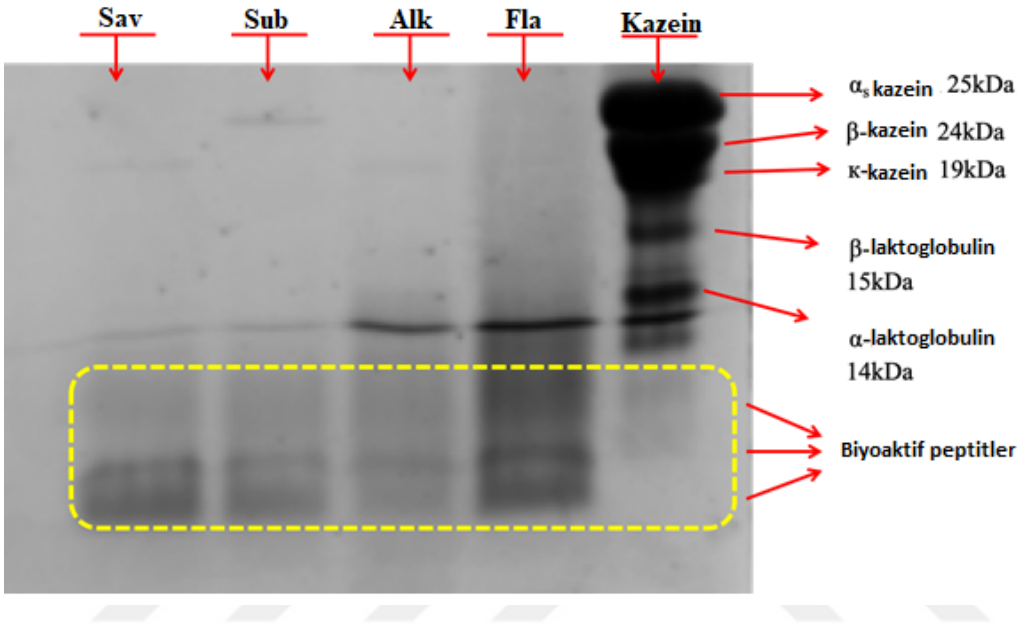
Süt protein ve hidrolizatlarına ait SDS-Page jel görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Süt proteinleri, kazein ve serum altı proteinlerinin farklı fraksiyonlarını içermekle birlikte 9-120 kDa arasında molekül ağırlığına sahip bant dağılımı sergilemektedir (Zenker vd., 2020; Cui vd., 2022). Jel görüntüsünde protein olarak ifade edilen örnek, hidroliz muamelesine tabi tutulmayan süt proteinidir. Hidrolizatların yüklendiği diğer kuyucuklarla kıyaslandığında süt proteinin üst bantlarda molekül ağırlığı yüksek olan protein moleküllerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Parçalanmanın etkisi ile proteazlar farklı derecede enzimatik aktiviteler göstererek üst bantların oldukça silikleşmesine bazı hidrolizatlarda ise tamamen yok olmasına sebep olmuştur. Hidroliz derecesindeki sonuçlara paralel olarak her bir hidrolizat örneği farklı bantlarda sıralanmıştır. Süt protein örneği ile kıyaslandığında hidroliz derecesinin en düşük olduğu flavourzyme hidrolizatının molekül ağırlığındaki değişim bantların büyük bir kısmının silinmesi ile görülmektedir. Parçalanmanın daha düşük düzeyde kaldığı flavourzyme ve alkalaz hidrolizatlarında az sayıda olmakla birlikte üst bantların varlığı dikkat çekmektedir. Hidroliz derecesinin artması ile birlikte üst bantların varlığı azalarak yok olmuş ve daha düşük molekül ağırlığını ifade eden yeni alt bantların oluşumu gözlemlenmiştir. Parçalanmanın en yüksek olduğu savinaz hidrolizatında en alt dolayısıyla en küçük molekül ağırlığına sahip peptid oluşumları gözlemlenmiştir. Süt protein ve hidrolizatlarının jel görüntülerinde sergilediği bantlar parçalanmanın boyutunu destekler niteliktedir.



Şekil 4.4 Süt proteini ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri

Kazein ve hidrolizatlarının SDS-Page jel görüntüsü Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Jelin en sağında bulunan hidrolize olmayan kazein protein ailesinin oldukça görünür olduğu, şerit boyunca yukarıdan aşağıya doğru α-kazein, β-kazein ve κ-kazein olarak sıralandığı görülmektedir. Literatürdeki birçok çalışmada da belirtildiği üzere inek sütü kazeini α-kazein, β-kazein ve κ-kazein fraksiyonlarından oluşmakta ve bu fraksiyonların moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 26–18 kDa arasında değişmektedir. Ayrıca kazein örneğinin şeritlerinde daha düşük moleküler ağırlıklara sahip olan α- ve β-laktoglobuline ait bantlar da bulunduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda, bu fraksiyonların moleküler ağırlıklarının sırasıyla 16–14 kDa bandında yer aldığı bildirilmiştir (Al-Shamsi vd., 2018; Li vd., 2018). Flavourzyme ile muamele edilen hidrolizatta, şerit boyunca önemli görünür bantlar olmadığı için enzim, kazein ailesinin tüm yapılarını büyük ölçüde parçalamış ve azaltmıştır. Yine de makropeptidlerin ve mikropeptidlerin bantlardaki varlığı, proteinin büyük ölçüde hidrolize olduğu anlamına gelmektedir. Alkalaz, subtilisin ve savinaz enzimleri ile parçalanan hidrolizatların, bazı küçük farklılıklar dışında birbirine oldukça benzer olduğu görülmektedir. Kazeine benzer şekilde, alkalaz ve flavourzyme enzim hidrolizatlarının şerit kısmında β-kazein alt birimine ait olduğu tahmin edilen küçük zayıf

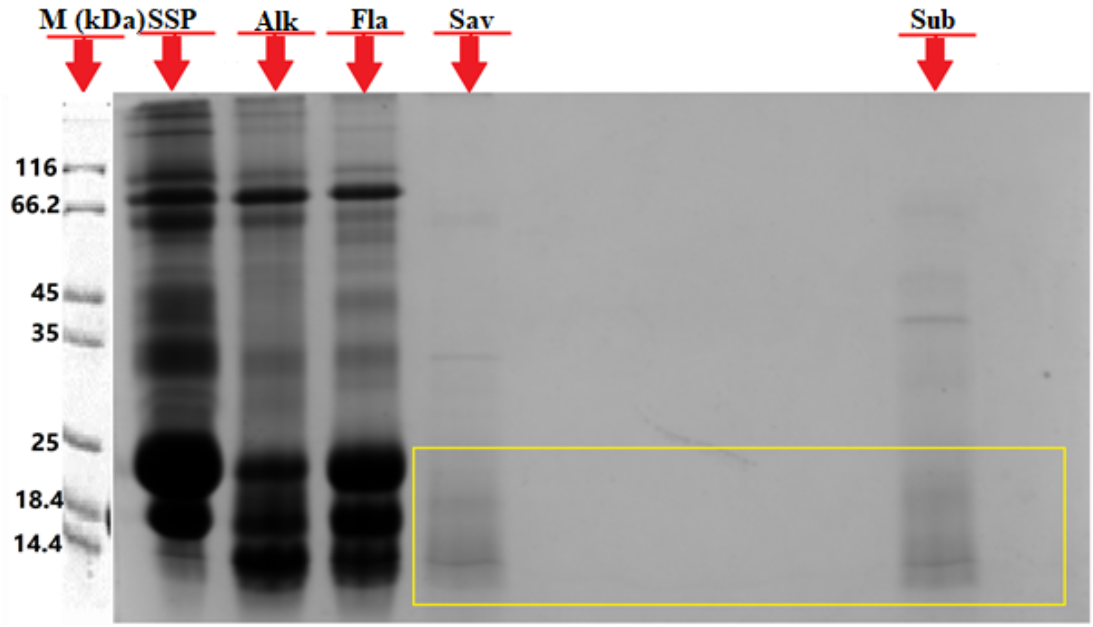
görünen bantlar tespit edilmiştir. Subtilisin ile hidrolize edilen numunede, protein şeridinin en üst kısmında büyük ihtimalle α-kazeinin parçalanması ile oluşan hafif görünür bir bant şekillenmiştir. Savinaz ile parçalanan hidrolizatta ise yine en küçük molekül ağırlığı ile ifade edilen yeni alt bantların oluşumu gözlemlenmektedir. Genel olarak, SDS-PAGE görüntüsü enzimlerin aktivitelerine göre hidrolizin derecesini oldukça destekler niteliktedir.



Şekil 4.5 Kazein ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri

Süt serum protein ve hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına göre sıralanması Şekil 4.6'da gösterildiği şekildedir. Süt serum proteinleri yapısında bulunan serum α-albümin, α-laktoalbumin ve β- laktoglobulinden 11-66 kDa arasında bant dizilimi göstermektedir (Zenker vd., 2020). Fakat jel görüntüleri incelendiğinde daha büyük molekül ağırlığına sahip bantların laktoferrin vb. gibi diğer süt fraksiyonlarına ait olabileceği düşünülmektedir. Diğer bütün protein hidrolizatlarında da gözlemlendiği gibi parçalanmanın boyutuna bağlı olarak her bir hidrolizat için farklı bantlar meydana gelmiştir. Örneğin SSP'nin yoğun olan üst bantları hidroliz derecesinin artması ile birlikte hidrolizatlarda daha aşağıdaki bantların oluşması ile şekillenmiştir. Parçalanmanın daha düşük düzeyde gerçekleştiği flavourzyme ve alkalaz hidrolizatlarında daha yakın molekül ağırlığına sahip bant oluşumları gerçekleşmiştir. Diğer iki hidrolizat örneklerine göre bu hidrolizatlarda parçalanma daha sınırlı düzeyde meydana gelmiştir. Flavourzyme (%4,90) ve alkalazın (%15,29) hidroliz dereceleri dikkate alındığında jel bantlarındaki

farklılıkların daha çok ortadaki bantlarda gerçekleştiği gözükmektedir. Savinaz ve subtilisin hidrolizatlarında ise parçalanmanın etkisi çok daha açık bir şekilde gözlemlenebilmektedir. Subtilisiin hidrolizi ile yalnızca birkaç tane kalan üst bantlar savinaz hidrolizatında iyice azalmış ve bir tane kalmıştır. Savinaz hidrolizatlarında kaybolan bu üst bantların yerine çok daha düşük molekül ağırlığına sahip biyoaktif peptidlerin oluştuğu yeni alt bantlar sıralanmıştır (Şekil 4.6).



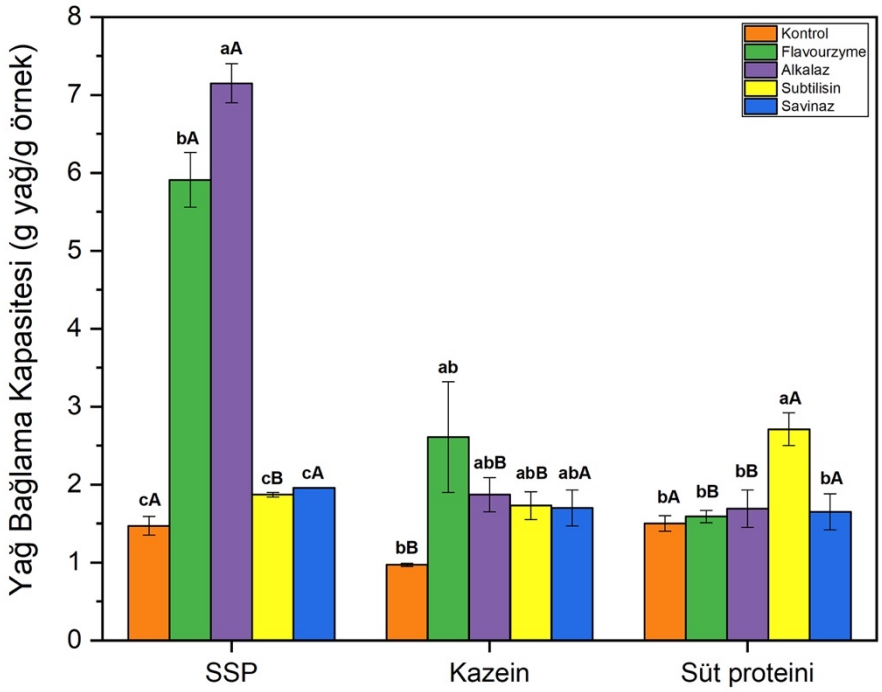
Şekil 4.6 Süt serum proteini ve hidrolizatlarının SDS-Page görüntüleri **(**M: molekül ağırlığı marker, Mecherfi vd., 2011)

4.3 Protein ve Hidrolizatların Teknolojik Özelliklerinin Karakterizasyonu

4.3.1 Yağ bağlama kapasitesi

Proteinlerin fonksiyonel karakterleri, büyük ölçüde proteinlerin bileşimlerine, organizasyonel davranışlarına, birbirleriyle ve ortamdaki diğer maddelerle ilişkilerine bağlı olmakla birlikte uygulanan proses ve muameleler ileşekillenmektedir (Chawla vd., 2017). Proteinlerin yağ bağlama kapasitesi (YBK), emülsiyonlarda ve çeşitli gıda sistemlerinde lipitlerle etkileşime giren yağın emilme ve tutulmasını ifade etmektedir (Sadh vd., 2018; Singh, 2011). Öncelikle protein kaynağı olmak üzere işleme koşulları, partikül boyutu ve sıcaklık gibi çeşitli faktörler proteinlerin emilimini dolayısıyla da yağ bağlama kapasitesini etkilemektedir (Shilpashree vd., 2015). Yüksek yağ ve su bağlama

kapasitesi süt proteinlerinin unlu mamuller başta olmak üzere birçok üründe aktif madde olarak kullanım olanaklarını da artırmaktadır. Proteinlerin kimyasal modifikasyonu, doğrudan kütle yoğunluğunu azaltarak yağın tutulmasını arttırır, bu nedenle yağın bağlanması protein içeriği ile doğrudan ilişkilidir (Agarwal vd., 2020). Yağ bağlama mekanizması, yağ emiliminin ortaya çıkmasına yardımcı olan yağ moleküllerine bağlanan birincil polar olmayan bölgelere sahip olan protein mikro yapılarının varlığı ile açıklanabilir (Kinsella, 1979). Yüksek YBK, çözünmeyen ve hidrofobik proteinlerde bulunan ve emülsiyon stabilizasyonunun geliştirilmesinde yer alan protein-lipid komplekslerinin oluşumu ile ilişkilidir (Agarwal vd., 2020).



Şekil 4.7 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait yağ bağlama kapasiteleri

Yağ bağlama kapasitesi, g yağ/g örnek olarak ifade edilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Süt proteini, kazein, SSP ve hidrolizatlarının yağ bağlama kapasitesi Şekil 4.7'de verilmiştir. Yağ bağlama kapasitelerinin değişimindeki önemli faktörlerden birinin farklı

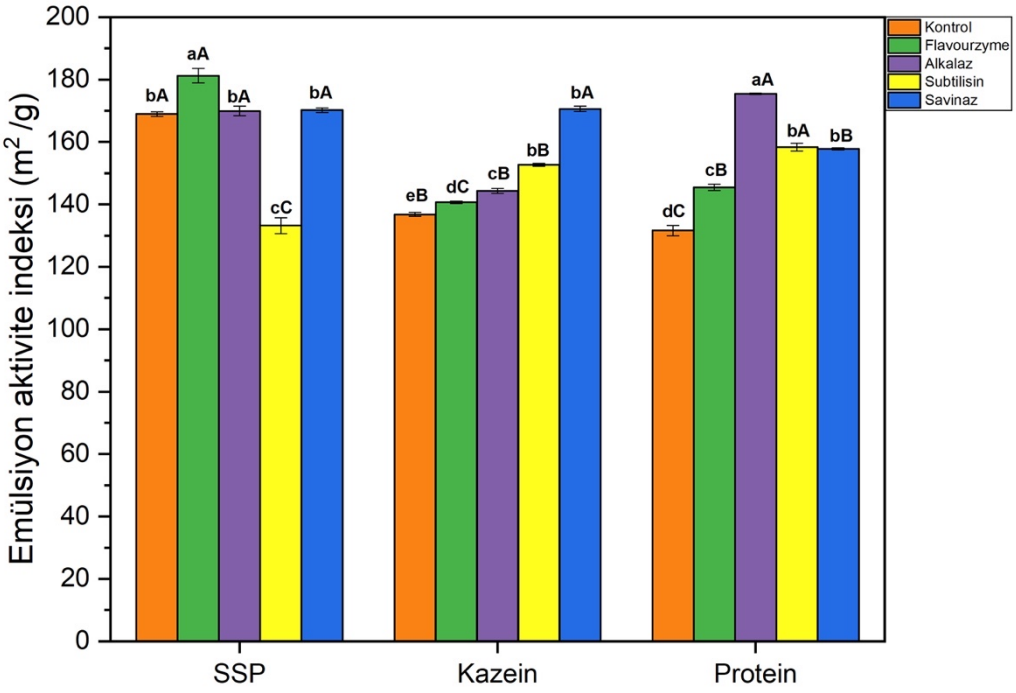
süt protein fraksiyonları olduğu görülmektedir. SSP ve hidrolizatları çalışmadaki diğer protein ve hidrolizatlara kıyasla çok daha yüksek bir YBK sergilemiştir ($p<0,05$). Kazein ve süt proteinlerinin YBK'lerinde türler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p> 0,05$). Enzimatik hidrolize tabi tutulmayan SSP'nin YBK 1,47 g yağ/g protein olarak belirlenmesine karşın, hidroliz muamelesiyle YBK geliştirilmiş ve alkalaz hidrolizatında 7,15 g yağ/g protein olarak tespit edilmiştir. SSP'inde olduğu gibi hidroliz muamelesi kazeinin YBK'sini (0,96 g yağ/g protein) önemli ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). Bu durumproteinlerin üçüncül yapısının enzimatik hidroliz ile parçalanması ve protein matrisinde yağlarla etkileşime girebilen polar olmayan yüksek yan zincirlerin ortaya çıkması ile açıklanabilir (Bozkurt vd., 2021). Kazein hidrolizatlarında YBK flavourzyme, alkalaz, subtilisin ve savinaz enzim hidrolizatları için sırasıyla 2,61, 1,87, 1,73 ve 1,70 g yağ/g protein olarak hesaplanmıştır. En düşük % HD'yi gösteren, flavourzyme ile muamele edilmiş kazein hidrolizatların YBK'sı (2.61 g yağ/g protein), hidrolize olmamış kazein ve diğer hidrolizat numunelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapıdaki bu değişiklik, protein yapısı parçalandıktan sonra yağ ile etkileşime girmeye hazır hale gelen hidrofobik amino asitlerle ilgili olabilir (Bekiroglu vd., 2022). Serin tipi enzimlerle muamele edilen hidrolizatların düşük YBK göstermesi, daha yüksek hidroliz nedeniyle oluşan peptidlerin boyutunun küçülmesi, esnekliklerinin azalması ve iyonlaştırıcı grupların ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Hidroliz işlemi süt proteinlerinin YBK'lerini geliştirmesine karşın, SSP ve kazeine kıyasla daha düşük düzeydedir. Diğer iki protein örneğindeki etkinlikleri karşılaştırıldığında flavourzyme ve alkalaz enzimleri süt proteininde YBK üzerine çok daha sınırlı bir katkı meydana getirmişlerdir. Süt proteinin YBK değerleri 1,5 ile 2,71 g yağ/g protein arasında değişim göstermiştir. Hidroliz derecelerinde meydana gelen farklılıklar dikkate alındığında flavourzyme süt proteininde kazein ve SSP'ne kıyasla daha yüksek HD (%8,08) etkisi göstermiştir. Dolayısıyla flavourzyme süt proteininde daha yüksek bir bozunmaya bağlı olarak ortamda daha fazla iyonlaştırıcı gruplar meydana getirmesi YBK'ni sınırlandırmıştır. Ağızda bırakılan his ve tat almayı iyileştirici etkisinden dolayı proteinlerin yağ bağlama kapasitesinin gıda uygulamaları (et ikamesi ve sulandırıcılar) için çok önemli bir parametre olduğu bilinmektedir (Kinsella & Melachouris, 1976). Genel olarak değerlendirildiğinde hidroliz prosesi YBK'sinde artış meydana getirmekle birlikte hidroliz derecesi ile ters yönlü bir ilişki göstermektedir. İlerleyen degradasyon ortama polar gruplar salınmasını artırarak hidrolizatların hidrofobikliğini ve dolayısıyla

yağları bağlama yeteneklerini azaltmaktadır. Yağ bağlama kapasitesinin geliştirilmesinde sınırlı hidroliz muamelesi daha etkili olmaktadır. Benzer sonuçlar subtilisin ve tripsin enzimleri kullanılarak üretilen mavi mezgit balığı hidrolizatlarında da tespit edilmiştir. Subtilisin, tripsin ve bu iki enzimin kombine halde kullanıldığı çalışmada hidroliz dereceleri %4, %8 ve %12 olarak üretilen mavi mezgit hidrolizatlarında YBK'nin kombine haldeki enzim hidrolizatları için 5,39 mL/g'dan 2,03 mL/g'a düştüğü bildirilmiştir (García-Moreno vd., 2017). Mavi mezgit (Geirsdottir vd., 2011), ringa (Sathivel vd., 2003) ve somon (Kristinsson & Rasco, 2000) balık hidrolizatlarının teknofonsiyonel özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda da YBK'nin kısmi yapılan bir enzimatik hidroliz ile geliştirilebileceğini ve artan degradasyon ile sınırlandırılabileceği ifade edilmiştir.

4.3.2 Emülsiyon Aktivite ve Stabilite İndeksi

Kazein, SSP, süt proteini ve hidrolizatlarına ait emülsiyon aktivite değerleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. SSP ve hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeks (EAI) değerleri 133,19±2,51 m^2/g ile 181,23±2,29 m^2/g arasında değişim göstermektedir. Hidroliz muamelesi SSP hidrolizatlarında kullanılan enzim çeşidine göre farklı emülsiyon aktivitelerinin oluşmasını sağlamıştır. En yüksek EAI değeri flavourzyme SSP hidrolizatında gözlemlenirken alkalaz enzim muamelesi ile en zayıf karakterli EAI tespit edilmiştir. Parçalanmanın birbirine en yakın olduğu savinaz (170,2±0,74 m^2/g) ve subtilisin (169,92±1,51 m^2/g) hidrolizatlarında ise emülsiyon stabilitesi kontrol SSP örneğine (168,92±0,7 m^2/g) göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Kazein ve hidrolizatlarının EAI değerleri ise 136,79±0,6 m^2/g ile 170,6±0,84 m^2/g arasında değişmiştir. Hidrolize olmamış kazein proteininde EAI en düşük düzeyde olmasına karşın artan HD ile birlikte doğru orantılı bir artış göstermiş, en yüksek EAI savinaz hidrolizatlarında bulunmuştur. EAI değerleri flavourzyme, alkalaz ve subtilisin enzimleri ile elde edilen kazein hidrolizatlarında parçalanma derecelerine paralel olarak sırasıyla 140,65±0,38 m^2/g, 144,34±0,79 m^2/g ve 152,7±0,49 m^2/g olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak birbirlerinden anlamlı farklıklar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Süt proteinin de ise degradasyonun ilerlemesi SSP'ndekine benzer bir etki meydana getirmiş ve yaklaşık %20,88 hidroliz derecesine kadar EAI değerlerini önemli derece geliştirmiştir ($p<0,05$). Fakat parçalanmanın ilerlemesiyle EAI'nde azalma meydana gelmiştir. En yüksek EAI alkalaz hidrolizatlarında (175,43± 0,22 m^2/g)

bulunurken, savinaz ve subtilisinde süt protein hidrolizatlarında sırasıyla 158,37±1,24 m^2/g ve 157,77±0,32 m^2/g'a kadar düşmüştür.



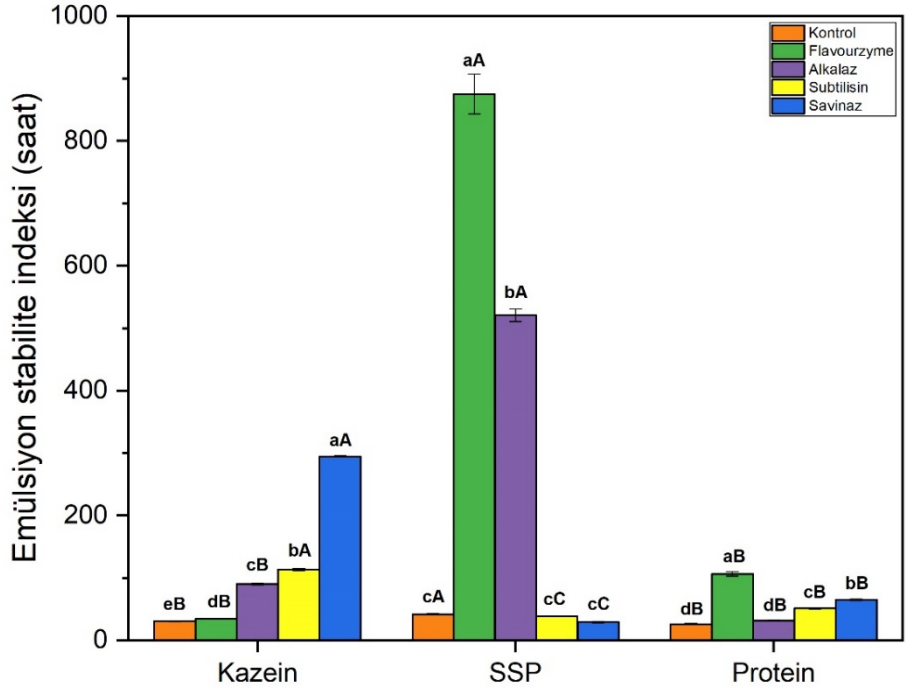
Şekil 4.8 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait emülsiyon aktivite indeksleri

SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Protein ve hidrolizatların emülsiyon stabilite indeksleri Şekil 4.9'da verilmiştir. SSP diğer protein örneklerinden istatiksel olarak anlamlı bir farklık göstermesine($p<0,05$) karşın, kazein ve süt proteinlerinin ESI değerlerinde anlamlı farklılıklar saptanmamıştır ($p>0,05$). SSP'nin flavourzyme ve alkalaz enzim muamelesi ile elde edilen hidrolizatlarında emülsiyon stabilite indeksleri önemli düzeyde artırılmıştır ($p<0,05$). Kontrol SSP için 41,7±1,4 sa. olan ESI flavourzyme hidrolizatında 875,02±32,04 saate, alkalaz hidrolizatında ise 520,95±10,15 saate kadar yükseltilmiştir. Kazein hidrolizatlarında hidroliz derecesinin artışına paralel olarak doğru orantılı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara sahip ESI değerleri gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 30,82±0,9 sa. stabil kalan kazein emülsiyonu, ilerleyen hidrolizle sürekli bir artış grafiği sergileyerek savinaz hidrolizatlarında 294,38±1,17 sa. süre ile stabil kalabilen emülsiyon oluşumu

göstermiştir. Süt proteininde ise ESI değerleri EAI benzer bir eğilim sergileyerek flavourzyme muamelesi ile en yüksek ESI (106,36±3,67 sa.) elde edilmiş, ilerleyen degradasyonla birlikte subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında 38,3±0,55 ve 29,4±1,11 saate kadar düşüş saptanmıştır. Hidroliz muamelesi bütün protein fraksiyonlarında daha kararlı ve stabil emülsiyonların oluşumuna katkı sağlamıştır. Farklı süt protein fraksiyonlarının emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri değerlendirildiğinde sadece hidroliz derecesinin bu karakter üzerine etkili olmadığı görülmektedir. Süt proteinleri üstün emülsifiye edici özelliklerinden dolayı birçok gıda formülasyonunda emülsifiye edici bileşenler olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tipik olarak su içinde yağ sistemleri olan gıda emülsiyonlarının üretimi, yağ-su arayüzlerinin oluşturulduğu ve yüzey aktif malzemelerin adsorpsiyonu ile stabilize edildiği oldukça enerjik ve dinamik bir süreçtir. Hidroliz işlemi, bütün protein örneklerinde üçüncül yapıda gömülü yapıları ortaya çıkararak emülsiyon özelliklerini geliştirecek olan polar ve disülfit yapılarının etkileşimini sağlamıştır (de Castro vd., 2015). Kazeinler, hidrofilik ve hidrofobik alanların iyi dengelenmiş dağılımı ile yüksek yüzey hidrofobikliğine sahip olduğu için yağ-su arayüzünde güçlü bir şekilde etkileşime girmelerine izin veren yüksek derecede konformasyonel esnekliğe sahiptir (Singh, 2011). Bundan dolayı enzimatik hidroliz derecesinin artışıyla birlikte EAI sürekli bir artış eğilimi göstermiş ve en yüksek savinaz kazein hidrolizatlarında tespit edilmiştir. Kazein hidrolizatlarının emülsifiye edici özellikleri, peptid ve amino asit bileşiminin oluşumu ile açıklanabilir (Al-Shamsi vd., 2018; Luo vd., 2014). Özellikle 2 kDa moleküler ağırlığa sahip kazein hidrolizatlarının emülsiyon stabilite indeksinin iyileştirilmesinde önemli faydalar sağladığı bildirilmiştir (Cornelly Van der Ven vd., 2002). Buna karşın, bulgularımızda da ifade edildiği gibi birçok kısa peptidin ortama salınmasını sağlayan aşırı hidrolizin (%20 HD üzerinde), SSP'nin emülsifiye edici ve stabilize edici özelliklerine zayıflattığı bildirilmiştir (Singh & Dalgleish, 1998). Düşük hidroliz derecesinin SSP'nin emülsiyon özelliklerine geliştirmektedir. SSP ve kazein daha kararlı emülsiyon oluşumunu sağlayan yağ-su arayüzüne hızla adsorbe özelliğine sahiptir. Buna karşın süt proteinin (komleks-toplanmış) emülsifiye edici özelliği, peynir altı suyu proteinleri veya sodyum kazeinatınkinden çok daha düşüktür yani, çok daha yüksek kompleks olmayan protein konsantrasyonları kararlı emülsiyonlar yapmak için gereklidir (Singh, 2011). Genel olarak, yüksek moleküler ağırlıklı peptidlerin emülsiyon stabilitesi için faydalı olduğu belirtilmektedir. Minimum 2 kDa'dan büyük (Caessens vd., 1999), 2,5 ve 5 kDa arasında

(Agboola vd., 1998) veya 5 kDa'dan büyük (Chobert vd., 1989) molekül ağırlığına sahip peptidleri içeren hidrolizatların güçlü emülsiyon stabilitesi sağladığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Van der Ven vd. (2001) kazein ve SSP peptidlerinde moleküler ağırlığı ile emülsiyon stabilitesi arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak tanımlayarak, genel olarak 2 kDa'dan daha büyük peptidlerin yüksek oranda gerekli olduğunu doğrulamışlardır. Peynir altı suyu proteini hidrolizatlarının 10 kDa üzerinde süzülmesiyle elde edilen peptid karışımları, tutulan maddeler ve ana hidrolizatlara kıyasla zayıf emülsiyon oluşturma yetenekleri göstermiştir (Mutilangi vd., 1996). Chobert vd. (1989), peynir altı suyu hidrolizatları için en az 5000 Da'lık bir moleküler ağırlık ile iyi bir emülsiyon stabilitesine ulaşıldığını bulmuşken, Singh & Dalgleish (1998) emülsiyon için sadece 500 Da'lık bir peptid uzunluğunun gerekli olduğunu bildirmiştir. Genel olarak peptid boyutunun, peptidlerin emülsiyon davranışını etkileyen tek faktör olmadığı düşünülmektedir. Birçok çalışmada gösterildiği gibi, peptidlerin amfifilikliği (hem hidrofilik ve hidrofobik özellikler taşıması), arayüzeysel ve emülsifiye edici özellikleri için önemlidir (Caessens vd., 1999; Rahali vd., 2000). Rahali vd. (2000) bir yağ/su arayüzünde adsorbe edilmiş β-laktoglobulin peptidlerinin amino asit sekanslarını analiz etmişler ve emülsiyon özellikleri için amfifilik karakterin peptid uzunluğundan daha önemli olduğunu bildirmişlerdir. Enzim spesifikliği emülsiyon özelliklerinin şekillenmesinde diğer bir önemli faktör olarak değerlendirilmektedir. Kazeinin enzimatik hidrolizinde, EAI ve ESI değerleri, 1 saatlik papain ve 24 saatlik pankreatin muamelesi dışındaki diğer tüm hidrolizatlarda artış göstermiştir. Bu çalışmadaki bulgular neredeyse aynı hidroliz derecelerine (yaklaşık %20) sahip olmalarına karşın kazeinin tripsin hidrolizatlarında, papain ve pankreatin hidrolizatlarına kıyasla daha yüksek bir EAI ve ESI ile sonuçlandığını göstermiştir (Luo vd., 2014). Bu durum HD, molekül ağırlığı, peptid uzunluğu yanısra enzim-subtrat özgünlüğünün emülsiyon karakterleri üzerindeki etkisinin ne kadar güçlü bir faktör olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait emülsiyon stabilite indeksleri

Emülsiyon stabilitesi saat olarak ifade edilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

4.3.3 Zeta Potansiyeli (Yüzey Yükü)

Koloidal sistemlerdeki tanecik yüzeyi ile tanecik yüzeyinin etrafındaki dispersiyon sıvısı arasında, itme ve çekme kuvvetine bağlı olarak değişen elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak isimlendirilmektedir. Genel olarak -30 mV ile +30 mV arasındaki zeta potansiyel değerlerinin daha iyi fiziksel koloidal stabilite elde etmek için yeterli itme kuvvetine sahip olduğu bilinmektedir. Koloidal parçacıklar yüzeylerinde yüzey potansiyeli olarak ifade edilen yüklerini biriktirebilirler. Yüzey potansiyeli, parçacıkların yüke dayalı koloidal etkileşimlerinin büyüklüğünü belirlemek için önemli bir faktördür. Zeta potansiyelindeki değişiklikler, koloidal sistemlerin kararlılığının belirlenmesinde önemli bir indikatör olarak değerlendirilebilir (Adjonu vd., 2014). Bunun yanısıra yüzey yükü, proteinin topaklanma ve dağılma potansiyellerini belirleyen önemli fiziksel

parametre olarak değerlendirilmektedir (Song vd., 2013). Yüksek zeta potansiyeli, moleküller ve moleküller arasındaki elektrostatik itmeyi artırarak proteinlerin yayılmasını teşvik edebilir, yani çözünme veya dağılma, topaklaşmaya karşı koyabilir ve böylece proteinleri dağılabilirliğini geliştirebilir (Du vd., 2022). Yüzey yükü aynı zamanda proteinlerin köpürme, çözünebilme, emülsiyon gibi teknolojik özelliklerinin şekillenmesinde de önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Wang vd., 2022). Genellikle zeta potansiyelinin azalması, arayüzdeki elektrostatik bariyerin azalmasına sebep olduğu için proteinlerin hava sıvı arayüzüne adsorpsiyonunu kolaylaştırmaktadır. Enzimlerin özgünlüğüne bağlı olarak ile ilerleyen proteoliz zeta potansiyel değerlerinin artmasını (- ya da + yönde) sağlamaktadır. Genel olarak, zeta potansiyelin artmasıyla itme kuvvetlerinin ve asılı partiküller arasındaki ayırma mesafesinin iyileştiği ve sistemin daha kararlı hale gelebildiği bildirilmiştir (Li vd., 2017). Daha yüksek zeta potansiyeli, protein yüzeyinde bulunan daha fazla yüklü gruplardan ve artan parçacık itmesinden kaynaklanmaktadır. Hidroliz muamelesi ile gelişen protein açılımı ve üçüncül yapıdaki değişikliklerde, protein yüzeyinde açığa çıkan daha yüklü grupların açığa çıkmasına ve dolayısıyla zeta potansiyelin artmasıyla sonuçlanmaktadır (Zhao vd., 2018). SSP, kazein, süt proteini ve hidrolizatlarının zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Bütün protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının yüzey yüklerinin negatif yüklere sahip olduğu görülmektedir. Enzimatik hidrolize tabi tutulmamış süt fraksiyonları ve hidrolizatlarının zeta potansiyel değerleri incelendiğinde genel olarak hidroliz işlemiyle zeta potansiyelinde artış meydana geldiği görülmektedir. Bu değişim özellikle SSP hidrolizatlarında gözlemlenmektedir. Kontrol SSP örneğinde -4,43±0,09 mV olan yüzey yükü, kullanılan enzim türüne bağlı olarak sırasıyla -10,41±0,54, -11,60±0,62, -18,00±0,30 ve -19,20±0,61 mV'a kadar yükselmiş ve parçalanma işlemi istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar meydana getirmiştir ($p<0,05$). En yüksek degradasyonun meydana geldiği savinaz enzim hidrolizatında yüzey yükü maksimum seviyeye ulaşmıştır. Kazeinin flavourzyme ve alkalaz muamelesi dışındaki hidrolizatları için de benzer bulgular tespit edilmiştir. -15,13±0,15 mV olarak ölçülen kazeinin yüzey yükü flavourzyme ve alkalaz enzimleri hidrolizatlarında küçük düşüşler meydana getirse de parçalanmanın çok daha yüksek olduğu (yaklaşık %26) subtilin ve savinaz enzim hidrolizatlarında sırasıyla -20,90±1,65 ve 24,33±0,51 mV olarak ölçülmüştür. Kontrol kazein örneğinin ve flavourzyme kazein hidrolizatlarının yüzey yükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir ($p> 0,05$). Süt protein

örneğinde ise diğer örneklere kıyasla zeta potansiyelindeki değişim bazı farklılıklar göstermiştir. Hidroliz işlemi protein örneğinin zeta potansiyelini önemli düzeyde ($p<0,05$) azaltmış olmasına karşın, farklı enzim türlerinden kaynaklı anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir ($p> 0,05$). Çalışmamızda özellikle subtilisin ve savinaz enzim hidrolizatlarının yüzey yüklerinde negatif yönlü önemli bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.1 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri

Örnek	Enzim Muamelesi	Yüzey yükü (mV)
SSP	Kontrol	$-4,43\pm0,09^{aA}$
	Flavourzyme	$-10,41\pm0,54^{bA}$
	Alkalaz	$-11,60\pm0,62^{bA}$
	Subtilisin	$-18,00\pm0,30^{cB}$
	Savinaz	$-19,20\pm0,61^{cB}$
Kazein	Kontrol	$-15,13\pm0,15^{cB}$
	Flavourzyme	$-14,96\pm0,29^{cC}$
	Alkalaz	$-11,43\pm0,49^{dA}$
	Subtilisin	$-20,90\pm1,65^{bB}$
	Savinaz	$-24,33\pm0,51^{aC}$
Süt Proteini	Kontrol	$-21,67\pm0,32^{bC}$
	Flavourzyme	$-12,67\pm0,32^{aB}$
	Alkalaz	$-12,17\pm0,22^{aA}$
	Subtilisin	$-12,43\pm1,23^{aA}$
	Savinaz	$-13,50\pm0,46^{aA}$

Zeta potansiyel milivolt (mV) olarak ifade edilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Bu durum, geniş bir degradasyon etkisiyle serbest karboksilik grupların negatif yüklü iyonlara aşırı ayrışması ve artan proteoliz ile oluşan negatif yüklü amino asit sayısının artması ile açıklanabilir (Liu vd., 2020). Du vd. (2022) keçi sütü SSP'ni 7 farklı proteazla hidroliz ettikleri çalışmada parçalanmayla birlikte kontrol SSP örneğine (−25,3±1,42 mV) kıyasla yüzey yükünün arttığını bildirmişlerdir. Protein verimi ve enzim türüne bağlı olarak bazı farklılıklar meydana gelse de en yüksek degradasyonu meydana getiren alkalaz (−28,8±0,51 mV) ve papain (−28,8±0,51 mV) hidrolizatlarında yüksek zeta potansiyel değerleri tespit edilmiştir.

4.3.4 Yüzey Hidrofobisitesi

Protein yüzeyinin hidrofobisitesi (S^o), yüzeydeki polar sulu ortamla temas halinde olan hidrofobik grupların sayısını ifade etmektedir (Bezerra vd., 2022). Yüzey hidrofobikliği, protein yüzeyinin bağlayıcı bir ajanla etkileşime girme olasılığı en yüksek bölgelerini belirlenmesinde kullanılmaktadır. Proteinlerin ve peptidlerin biyolojik ve tekno-fonksiyonel özellikleriyle yakından ilişkili olan yüzey hidrofibikliği (Lieske & Konrad, 1994), proteinlerin ve peptidlerin farklı gıda uygulamalarında ana ve yardımcı bileşen olarak kullanımına olanak sağlayan jelleşme, emülsiyon ve köpürme gibi kritik özellikleri etkileyen yapıyı önemli ölçüde etkilemektedir (Wang vd., 2014). Proteinlerin makromoleküler yapısı nedeniyle yüzey hidrofobikliği, teknolojikkarakterler üzerinde toplam hidrofobikliğe göre daha fazla etkiye sahiptir. Yüzey hidrofobikliği, protein molekülünün boyut şekil gibi fiziksel özellikleri yanısıra amino asit bileşimi, sekans ve molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlara bağlı olması gibi yapısal özellikler ile yakından ilişkilidir (Aider vd., 2012). Kazein, SSP ve protein örneklerinin yüzey hidrofobisite değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Bütün örneklerin yüzey hidrofobisitelerinde hidrolizin derecesi ve enzim türüne bağlı olarak değişimler meydana geldiği tespit edilmiştir. SSP ve hidrolizatlarının yüzey hidrofobisiteleri 28582,12±159,33 ile 5320,24±15,92 arasında değişim göstermiştir. SSP hidrolizatlarının hepsinde kontrol SSP örneğine göre anlamlı farklılıklar meydana geldiği görülmektedir. Hidrolizle birlikte bütün örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). En yüksek parçalanma derecelerinin meydana geldiği subtilisin ve savinaz SSP hidrolizatlarında yüzey hidrofobisiteleri sırasıyla 4448,76 ±25,54 ve 5320,24 ±15,92'lere kadar azalmıştır. Kazein ve protein hidrolizatlarında hidrolizin benzer şekilde

etkiler meydana getirdiği tespit edilmiştir. Kontrol kazein örneğinde 6780,12 ±20,26 olan yüzey hidrofobisitesi flavourzyme muamelesi ile 1971,00±11,91'e kadar düşüş gösterirken hidrolizin ilerlemesiyle subtilisin ve savinaz enzim hidrolizatlarında 868,84±9,53 ve 893,37±8,83 olarak hesaplanmıştır. Benzer bulgular protein örneği ve hidrolizatlarında da tespit edilmiştir. Kontrol protein örneğinde yüzey hidrofobikliği 8620,18±107,87 olarak hesaplanırken bütün hidrolizat örneklerinde azalma meydana gelmiş ve bütün örnekler arasında anlamlı farklılıklar olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). 4837,7±35,50 ile 867,92 ±23,53 arasında değişim gösteren protein hidrolizatlarının yüzey hidrofobisitelerinde, parçalanmanın artması ve ortama daha küçük molekül ağırlıklı peptidlerin salınmasıyla paralellik gösteren bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu azalma parçalanmanın derecesinden çok hidrolizat üretiminde kullanılan enzim türüne göre şekillenmiştir. Bütün örneklerde alkalaz hidrolizatlarının yüzey hidrofobikliği diğer hidrolizatlara ve özellikle de parçalanmanın daha düşük olduğu flavourzyme hidrolizatlarına kıyasla beklenmedik bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bu durum, alkalaz muamelesinden sonra mevcut olan amino asit kalıntılarının daha az polar olabileceğini veya peptidlerin daha hidrofobik karakterli serbest amino asitlere hidrolize edilebilmesiyle ilişkili olabilir. Alkalazın yüzey hidrofobisitesinde gösterdiği etki, hidroliz prosesinde en önemli faktörlerden biri olan enzim özgünlüğü ile de açıklanabilir. Adamson & Reynolds (1996) kazein fosfopeptidaz karakterizyonunda enzim spesifikliğini inceledikleri çalışmada protein diziliminde Glu, Met, Leu, Tyr, Lys ve Gln amino asitlerinin konumlandığı bölgelere göre farklı peptid bağlarında parçalanma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu dizilimde P1'de konumlandığında Glu amino asitinde olan peptid bağları degrade olurken, P3 veya P4'te başka bir hidrofobik aminoasitte peptid bağlarının parçalandığı tespit edilmiştir. Alkalaz aromatik (Phe, Trp ve Tyr), asidik (Glu), kükürt içeren (Met), alifatik (Leu ve Ala), hidroksil (Ser) ve bazik (Lys) aromatik amino asit kalıntılarını içeren peptid bağlarını hidrolize etmek için yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Triptofanil grubunun en hidrofobik protein grubu olması bunu tirozil ve fenilalanin grubunun izlemesi, alkalaz hidrolizatlarında yüzey hidrofobisitesinin diğer hidrolizatlara kıyasla çok daha yüksek olmasını açıklayabilir. Benzer şekilde bakla protein izolatının alkalaz enzimi ile farklı hidroliz derecelerine parçalandığı bir çalışmada da kısmı hidrolizde (%4 HD) en fazla hidrofobik gömülü grubun açığa çıktığı ve en yüksek yüzey hidrofobisitesinin olduğu gözlemlenmiştir (Liu vd., 2019). Proteinin hidrofobisitesinin temel olarak çözücü su ile temas halinde bulunan polar kalıntı tabakası

ile çevrili hidrofobik bir çekirdek oluşturan gruplandırılmış polar olmayan amino asitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Aider vd., 2012). Polar olmayan amino asit kalıntılarının kendilerini protein moleküllerinin iç kısmında konumlandırma ve böylece sulu çevre ile temastan kaçınma eğilimleri nedeniyle, bunların sadece bir kısmının hidrofobiklikte etkili olduğu kabul edilmektedir (Aider vd., 2012). Süt protein konsantresinde yapılan bir çalışmada alkalaz, flavourzyme ve protemaks enzim hidrolizatları üretilmiş ve sonuçlarımıza paralellik gösteren bulgular rapor edilmiştir.

Tablo 4.2 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarına ait yüzey hidrofobisiteleri (S^o)

Örnek	Enzim Muamelesi	Yüzey hidrofobisitesi (S^o)
SSP	Kontrol	$28582,12 \pm 159,33^{aA}$
	Flavourzyme	$17782,22 \pm 85,95^{cA}$
	Alkalaz	$26105,38 \pm 30,23^{bC}$
	Subtilisin	$4448,76 \pm 25,54^{eA}$
	Savinaz	$5320,24 \pm 15,92^{dA}$
Kazein	Kontrol	$6780,12 \pm 20,26^{aC}$
	Flavourzyme	$1971,00 \pm 11,91^{bB}$
	Alkalaz	$6808,67 \pm 18,04^{aB}$
	Subtilisin	$868,84 \pm 9,53^{cB}$
	Savinaz	$893,37 \pm 8,83^{cB}$
Süt Proteini	Kontrol	$8620,18 \pm 107,87^{aB}$
	Flavourzyme	$1930,5 \pm 33,23^{cB}$
	Alkalaz	$4837,7 \pm 35,50^{bA}$
	Subtilisin	$914,08 \pm 15,37^{dB}$
	Savinaz	$867,92 \pm 23,53^{dB}$

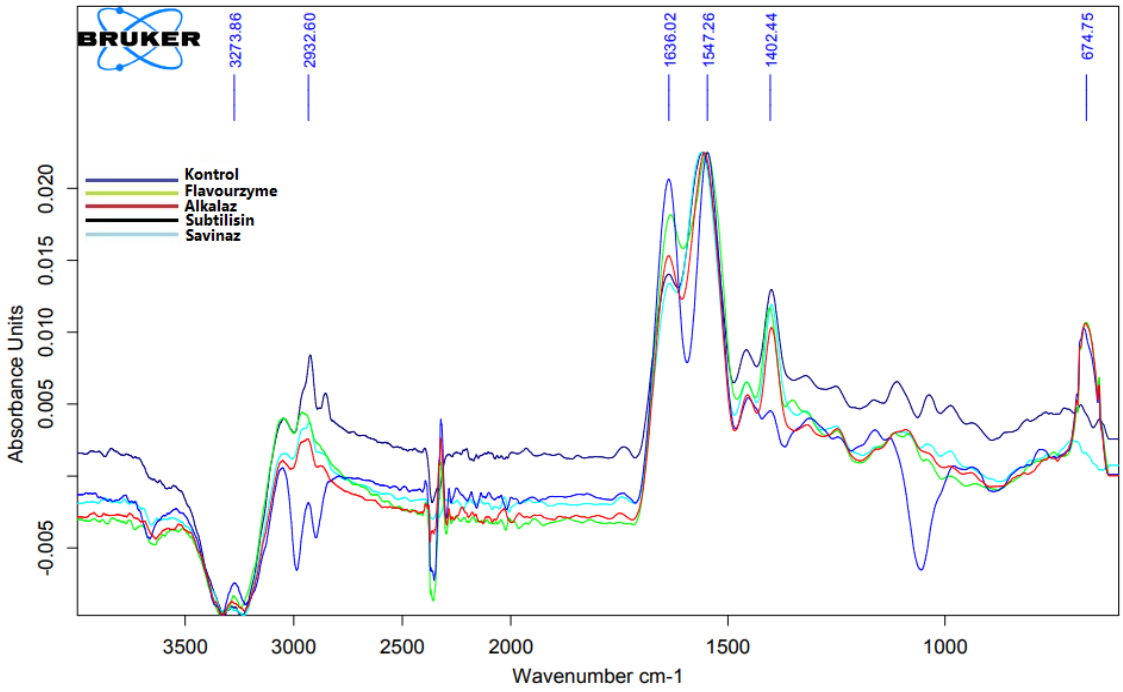
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Cui vd. (2021) hidroliz ile süt protein konsantresinin yüzey hidrofobisitesinin önemli ölçüde azaldığını ve bu azalmanın parçalanmanın derecesiyle negatif yönlü bir bir ilişki sergilediğini bildirmişlerdir. Zang vd. (2019) enzimatik hidrolizle ortalama salınan serbest hidrofobik amino asitler ve proteinin yeniden düzenlenmesine yol açan artan hidrofobik etkileşim nedeniyle olabilecek HD'deki artışın yüzey hidrofobisitesinde azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Yüzey yükünde meydana gelen bu değişim, protein konformasyonunda meydana gelen modifikasyon ile ilişkilendirilmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde hidroliz muamelesi protein yapısının açılmasına ve daha önce proteinin içinde gömülü olan hidrofobik grupların açığa çıkararak yüzey hidrofobikliğini artırabileceği düşünülse de bu çok sınırlı düzeyde gerçekleşen hidroliz (%3 HD) muamelelerinde gözlemlenebilmektedir. Çalışmamızdaki ve literatürdeki bulgular, yüzey hidrofobisitesindeki bu azalmanın enzimatik parçalanma ile üretilen serbest hidrofobik amino asitlere ve protein agregasyonuna yol açan artan hidrofobik etkileşimlere atfedilebileceğini göstermektedir. Banach vd. (2013) yüzey hidrofobisitesindeki azalmanın artan çözünürlüğe katkıda bulunduğunu bulmuşlardır. Enzimatik hidrolizden sonra yüzey hidrofobikliğindeki değişiklik, daha polar hidrofilik fonksiyonel grupların salınmasına bağlı olabilir, böylece protein çözünürlüğünü geliştirmektedir.

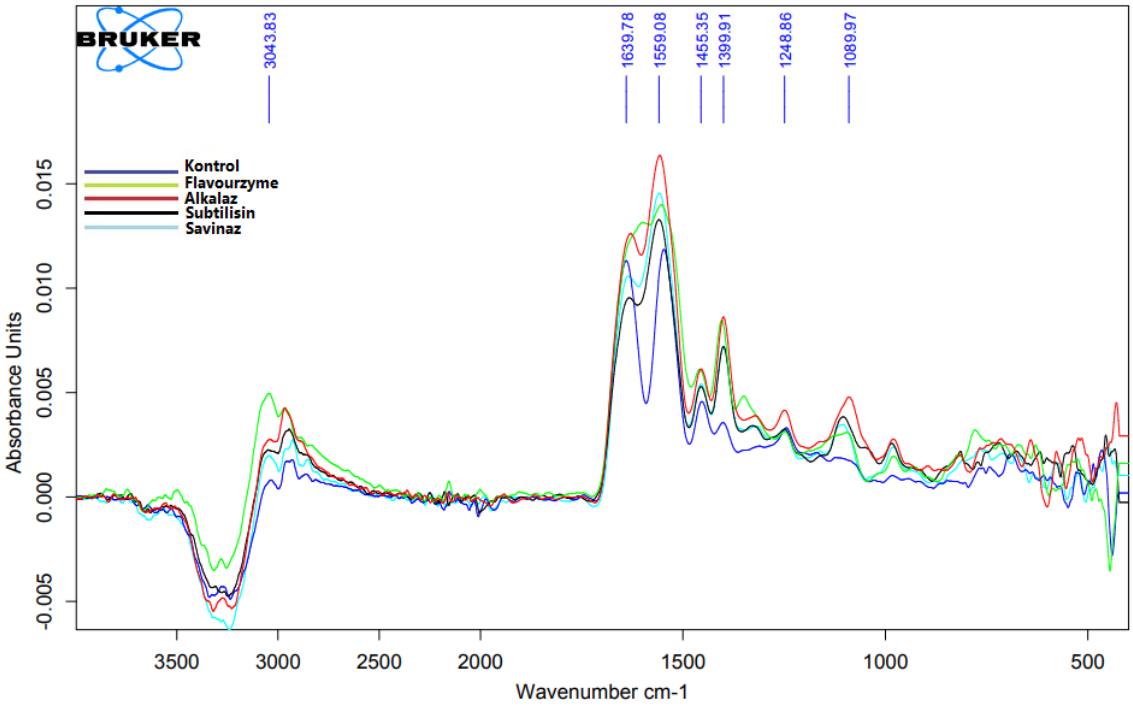
4.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Sekonder Yapıdaki Değişim

SSP, kazein, süt proteini ve bunların hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. FTIR spektrumlarında da gösterildiği gibi proteinlerin uygulanan enzimatik hidroliz muamelesine bağlı olarak sekonder yapıda meydana gelen değişimleri belirli bölgelerde çok daha önemli farklılıklar meydana getirerek farklı piklerin oluşmasına veya daha da belirginleşmesine sebep olmuştur. Bütün süt protein fraksiyonlarında da ortak olarak gözlemlendiği gibi hidroliz muamelesi özelliklede enzim türüne ve hidroliz derecesine bağlı olarak Amid I bölgesi olarak ifade edilen 1600-1700 cm^{-1} arasındaki spektrumlarda önemli değişimlerin meydana gelmesini sağlamıştır. Amid I (1650 cm^{-1}) ve Amid II (1545 cm^{-1}) bantları, proteinlerin karakterizasyonu için en yaygın olarak kullanılan Amid spektral bantlarıdır. Çoğunlukla C=O germe titreşimleri ve C-N gruplarından oluşan 1600 ile 1700 cm^{-1} arasındaki Amid I bandının tepe konumu, omurga konformasyon ve hidrojen bağ modeli tarafından

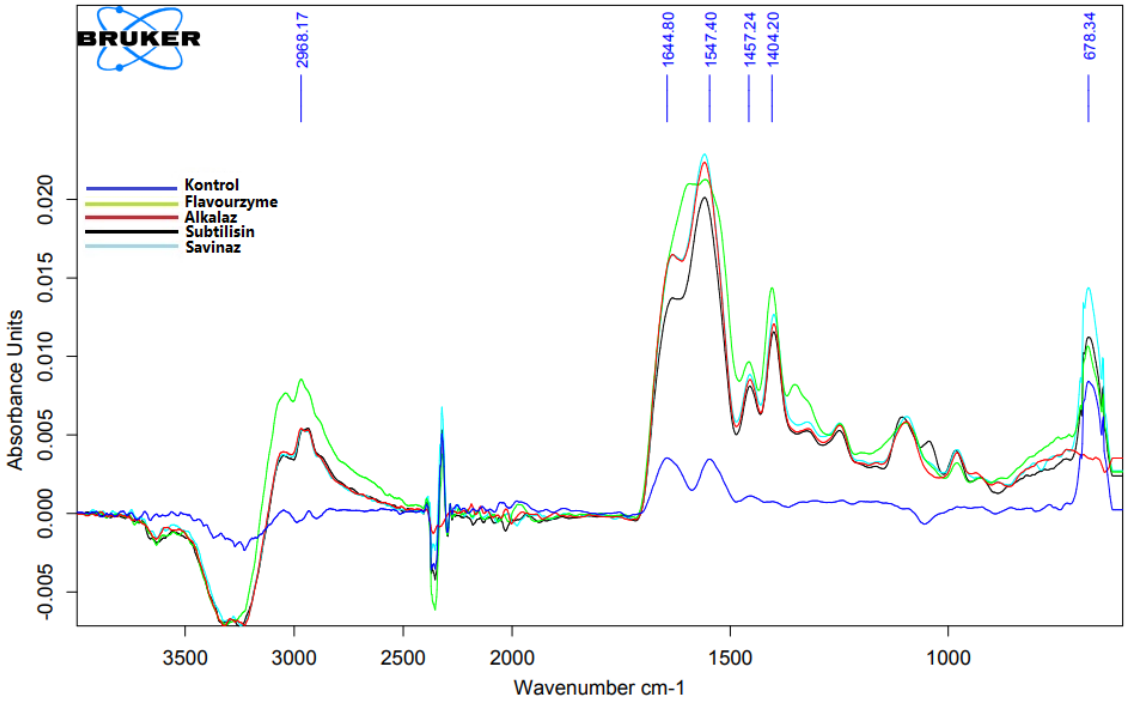
belirlenmektedir. 1510 ve 1580 cm^{-1} arasındaki Amid II bandı, öncelikle N-H bükülmesi olmak üzere, C-N ve C-C gerilme titreşimlerinden oluşmaktadır (Schüle vd., 2007). Bükülme modu su bandının (1635 cm^{-1}) Amid I ile güçlü örtüşmesi nedeniyle, ikincil yapıyı ayırt etmek için Amid III (1300–1200 cm^{-1}) gibi diğer bantların kullanılabileceğini de öne süren çalışmalar bulunmaktadır (Goormaghtigh vd., 2006). Ancak araştırmaların çoğu etkili analiz ve yapı aydınlatması için hala Amid I ve II bantlarının kullanılmasının çok daha doğru bir yaklaşım olduğunu vurgulamaktadır (Tiernan vd., 2020).



Şekil 4.10 SSP ve farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları



Şekil 4.11 Kazein ve farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları



Şekil 4.12 Süt proteini ve farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini hidrolizatlarına ait FTIR spektrumları

Biyoaktif bileşiklerin sınıflandırılması kimyasal yapıları, fiziksel-kimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerine göre yapılabilmektedir (Butu vd., 2014). FTIR spektroskopisi, bir maddenin karakteristik fonksiyonel gruplarını tanımlamak ve moleküler dipollerin salınımından kaynaklanan moleküler titreşimlere göre moleküller arasında ayrım yapmak için kullanılan bir teknik olarak değerlendirilmektedir. Her bileşik, FTIR'da parmak izi bölgesi olarak ifade edilen kendi benzersiz tepe modelini üretmektedir (Samfira vd., 2015). Genel olarak proteinlerin yapısal değişikliklerinin %90'ından fazlası sadece Amid I bandı incelenerek açıklanabilmektedir (Recio vd., 2019). C=O arasındaki gerilme titreşimi ile ortaya çıkan Amid I bandının merkezinin 1650 cm^{-1} civarında olduğu kabul edilmektedir (Wang vd., 2013). 1617, 1622, 1632, 1645, 1654 ve 1670'deki bantların, Amid I bandının ters kıvrımını oluşturarak bağlardaki yapısal değişiklikleri tahmin etmek için kullanılmaktadır. Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilen spektrumlarda, Amid I bölgesinde 1617, 1622 ve 1635 cm^{-1}'de gözlenen bantlar, β-sheet yapılarıyla ilişkilendirilmektedir. 1645 cm^{-1}'de gözlemlenen bantlar ise rastgele sarmal yapısından kaynaklanabilmektedir. Protein örneklerinde 1654 cm^{-1}'de gözlemlenen bantlar α-heliks yapısıyla ilişkilendirilirken, 1670 cm^{-1}'in ise β-turn bağının varlığı ile açıklanmaktadır. SSP ve hidrolizatlarının sekonder yapılarında enzimatik hidroliz muamelesine bağlı olarak meydana gelen değişim Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Tablodaki bulgulardan gözlemleneceği gibi hidroliz muamelesi özellikle α-heliks, β-turn ve rastgele sarmal yapılarında önemli değişimler meydana getirmiştir. Kontrol SSP örneği %37,25 α-heliks yapısından meydana gelirken hidroliz muamelesiyle önemli düzeyde bir azalma meydana gelmiş ve en yüksek hidroliz derecesine sahip olan savinaz SSP hidrolizatı için bu oran %20,18'a kadar düşmüştür. Buna karşın savinaz hidrolizatına yakın düzeyde bir parçalanmanın meydana geldiği subtilisin hidrolizatında α-heliks yapısı hidrolize olmayan SSP örneğiyle neredeyse aynı oranda olarak tespit ediliştir. α-heliks yapısındaki değişimlerin parçalanma deresinden çok daha enzim substrat ilişkisine bağlı olarak meydana geldiği söylenebilmektedir. β-turn yapılarındaki değişim incelendiğinde ise hidroliz muamelesi ile önemli düzeyde bir artışın meydan geldiği, en yüksek β-turn yapılarına sahip hidrolizatların sırasıyla alkalaz (%24,13) ve savinaz (%23,10) SSP hidrolizatlarında olduğu saptanmıştır. Rastgele sarmal yapılarındaki değişim de β-turn yapısındaki değişime benzer şekilde artış göstermiş ve en yüksek β-turn yapısı savinaz (%17,79) ve subtilisin (%17,19) hidrolizatlarında meydana gelmiştir.

Kazein ve hidrolizatların ikincil yapılarındaki değişiklikler Tablo 4.3'te gösterilmiştir (Kher vd., 2007). Amid I bölgesindeki bantların dekonvülasyonu ile hesaplanan tüm ikincil yapılarda farklılıklar tespit edilmiştir. Herhangi bir enzim işlemine tabi tutulmayan kazein %17,27 α-heliks, %50,73 β-sheet, %10,54 β-turn, %21,4 rastgele sarmaldan oluşmuştur.

Tablo 4.3 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının sekonder yapısındaki değişimler

Örnek	Enzim muamelesi	α-Heliks (%)	β-sheet (%)	β-turn (%)	Rastgele sarmal (%)
SSP	Kontrol	37,25	39,43	13,17	10,16
	Flavourzyme	22,84	43,40	17,08	16,68
	Alkalaz	22,14	41,29	24,13	12,44
	Subtilisin	37,46	30,92	14,43	17,19
	Savinaz	20,18	38,94	23,10	17,79
Kazein	Kontrol	17,27	50,73	10,54	21,47
	Flavourzyme	12,85	66,54	3,13	17,49
	Alkalaz	13,36	62,30	5,38	18,96
	Subtilisin	14,22	61,94	4,26	19,59
	Savinaz	15,36	60,70	4,30	19,67
Süt proteini	Kontrol	32,18	25,14	18,3	24,38
	Flavourzyme	22,71	42,70	23,18	11,40
	Alkalaz	17,77	41,76	32,20	8,26
	Subtilisin	16,70	34,11	34,02	15,16
	Savinaz	21,14	33,73	22,33	22,80

SSP: Süt serum proteini.

Tüm hidrolizatların α-heliks ve β-turn yapılarının kazein yapısına göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu iki yapıdaki değişim, HD'deki artışla ters orantılı olarak meydana gelirken en büyük değişim, flavourzyme hidrolizatında gözlemlenmiştir. Hidrolizatların β-sheet yapısının içeriği hidroliz işlemi ile arttırılmış ve yine en yüksek içerik flavourzyme hidrolizatında belirlenmiştir. Ayrıca hidroliz süresindeki artışın kazeinin ikincil yapılarında önemli farklılıklara neden olduğu gözlemlenmiştir. Kazein de dahil olmak üzere globüler proteinlerin β-sheet yapısı çok kısadır ve bu yapılar iki veya üç kadar çok sınırlı sayıda zincir içermektedir (Susi & Byler, 1988). Peptid zincirlerinin enzimatik olarak parçalanması sonucu kazeinin küresel şekli açılmış ve β-turn oranı azalmıştır. Sonuç olarak β-sheet yapı oranı artmış ve daha uzun-yapraklı zincirlerin oluşumu gözlemlenmiştir (Barth, 2007). Deng vd. (2016)'nın buğday gluteninin fonksiyonel özelliklerinin enzimatik hidroliz ile iyileştirildiği çalışmasında da sekonder yapı değişimlerinde benzer bulgular elde edilmiştir. Bozkurt vd., (2021) gluteninin hidrolizinde β-sheet yapısındaki değişikliğin, proteinin diğer ikincil yapılarına göre çok daha yüksek oranda arttığını bildirmişlerdir. Genel olarak değerlendirildiğinde hem hidrolizat örnekleri hem de kazein örneğinde rastgele sarmal içeriğindeki fark çok daha düşük düzeyde kalmıştır.

Süt protein ve hidrolizatlarının sekonder yapılarındaki değişim incelendiğinde ise α-heliks, β-sheet, β-turn yapılarında önemli oranda değişimlerin meydana geldiği görülmektedir. Süt protein örneği %32,18 α-heliks, %25,14 β-sheet, %18,3 β-turn ve %24,38 rastgele sarmal yapılarından meydane gelirken α-heliks yapısında degradasyonla birlikte güçlü bir azalma meydana gelmiş ve yüksek hidroliz derecesine sahip olan alkalaz ve subtilisin hidrolizatlarında sırasıyla %17,77 ve %16,70'e kadar düşüş gözlemlenmiştir. β-sheet yapısında meydana gelen değişim ise flavourzyme hidrolizatında (%42,70) en yüksek oransal artışı meydana getirirken degradasyonun artmasına paralel olarak daha azalan bir ivme ile artış sağlamıştır. Süt proteininde yapının yaklaşık %25'i β-sheet yapısı oluştururken, alkalaz, subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında sırasıyla %41,76, %34,11 ve %33,73 olarak tespit edilmiştir. Hidroliz muamelesi β-turn yapısında β-sheet yapısındakine benzer bir etki meydana getirerek ikincil yapıda β-turn yapının oransal miktarını artırmıştır. Süt proteninde %18,3 olan β-turn yapı flavourzyme ve savinaz hidrolizatlarında daha az bir artış sağlarken alkalaz ve subtilisin hidrolizatlarında ikincil yapının sırasıyla %32,20 ve %34,02'sini oluşturmaktadır. Süt proteinin rastgele sarmal

yapısında hidroliz muamelesi ile ters orantılı olarak bir azalma meydana gelmiş özellikle alkalaz enzim muamelesiyle %8,26'lara kadar gerilemiştir.

4.5 Protein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özelliklerinin Karakterizasyonu

Süt proteinleri ve bunların hidroliz ürünleri, yüksek düzeyde biyolojik aktivite ile karakterize edilmektedir. Sığır sütü proteinlerinin, peptidlerinin ve amino asitlerinin sağlığı geliştirme potansiyeli, antioksidan, antienflamatuar ve bağışıklık sistemi uyarıcı özelliklerine bağlanabilmektedir. Süt proteinleri, peptidler ve enzimler, serbest radikalleri temizleyerek, metalleri şelatlayarak ve antioksidan enzimleri aktive ederek insan vücudunda prooksidan/antioksidan homeostazının korunmasında rol oynamaktadır. Laktoperoksidaz, lizozim, immünoglobülinler, laktoferrin ve bazı süt türevi peptidler antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Laktoferrin, IgA ve IgG antikorlarının sentezini artırarak ve hücrelerin üretimini uyararak antiinflamatuar ve immüno-uyarıcı etkiler göstermektedir. Sığır laktoferrinin antikanserojenik potansiyeli, yüksek oranda metastatik meme kanseri, prostat kanseri, osteosarkom, akciğer kanseri ve gastrik adenokarsinom hücre hattında gözlemlenmiştir (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Süt proteinleri ve peptidleri, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini belirleme ve ortadan kaldırma yeteneğini artırarak sağlık yararları sağlamaktadır. Süt proteinlerinden elde edilen peptidlerin fonksiyonel önemi ve sağlık üzerine olan yararları, biyoyararlanımlarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Peptidler, yalnızca reseptörlerle etkileşimleri sırasında kararlı doğal yapıları korunursa biyolojik olarak aktif halde bulunmaktadır.

4.5.1 Antioksidan Aktivite

Gıda ürünlerinde sentetik antioksidanların kullanımı, sağlıkla ilgili olası sorunlara sebep olması, artan tüketici bilinci ve buna bağlı çevresel sorunlar nedeniyle istenmemektedir. Bu sorunun olası bir çözümü, serbest radikalleri nötralize eden ve insan vücudunun hücre zarını koruyan doğal antioksidanlardan yararlanmaktır. ABTS+'nin katyonik radikal süpürülme aktivitesi, gıda bileşenlerinin ve işlenmiş gıda ürünlerinin antioksidan aktivitesini ölçmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Reaktifler hem sulu hidrofilik hem de organik çözücü hidrofobik gruplarda iyi çözünebildiğinden ABTS hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanları ölçebilmektedir. Etkinliği aromatik halkaların sayısına, hidroksil gruplarının doğasına ve molekül ağırlığına bağlı değişim göstermektedir (Bottani vd., 2020).

Süt proteinleri reaktif oksijen türlerini (ROS) yakalama, metalleri şelatlama ve ROS üretiminde ve ortadan kaldırılmasına katılan enzimleri modüle etmek gibi çok yönlü antioksidan etki mekanizmalarına sahiptir (Bottani vd., 2020). Kazein fraksiyonları, antioksidan peptidler dahil olmak üzere birçok biyopeptidlerin öncüsü olarak kabul edilmektedir (Power vd., 2013). Peptidlerin biyolojik aktivitesi, amino asit dizisi, yapısı, konfigürasyonu ve moleküler ağırlığı ile belirlenmektedir. Triptofan, tirozin, histidin, prolinden oluşan peptidler güçlü antioksidanlar grubunda yer almaktadır. Peptid yapısında bulunan hidrofobik amino asitler (lösin veya valin), peptidlerin antioksidan aktivitelerini ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneklerini etkilemektedir.

Peynir altı suyu proteininin antioksidan aktivitelerinin ise histidin ve diğer hidrofobik amino asitlerin içeriği ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Protein içeriği, protein hidroliz derecesi ve denatürasyon da önemli bir rol oynamaktadır. Peynir altı suyu proteinlerinin antioksidan özellikleri serbest radikalleri temizleme, metalleri şelatlama ve proteinlerdeki SH tiyol gruplarını geri kazanmalarıyla gerçekleşmektedir. Peynir altı suyu proteininin hidrolizi ile ortama yüksek antioksidan kapasiteli peptidler salınmaktadır (Power vd., 2013). Laktoferrin demiri şelatlayarak biyoyararlanımını arttırır ve pro-oksidan etkileri inhibe etmektedir. Bununla birlikte, Laktoferrinin antioksidan kapasitesi, demirle doyma derecesine bağlı orantılı olarak azalmaktadır (Cutone vd., 2020). β-laktoglobulinin antioksidan aktivitesi ayrıca yüksek kükürt içeren amino asitler (SAA) içeriğine, özellikle Cys-121'e bağlanabilir. Sütün antioksidan kapasitesi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve laktoperoksidaz (LPx) enzimlerinden etkilenmektedir. Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikallerini H_2O_2 ve O_2'ye dönüşümünde etkili olarak antioksidan kapasitesine katkı sağlamaktadır. β-Laktoglobulin, LDL'nin bakır aracılı oksidasyonuna dayalı olarak değerlendirilen çiğ sütün toplam antioksidan kapasitesinin yaklaşık %50'sinden sorumlu fraksiyon olarak değerlendirilmektedir (Liu vd., 2007). β-laktoglobulin, proteinlerin alerjenik potansiyelini azaltan ve ince bağırsakta oksidasyonunu azaltarak antioksidan kapasitesini artıran A vitamini ve polifenoller dahil olmak üzere çeşitli hidrofobik molekülleri bağlamaktadır (Belatik vd., 2012; Wu vd., 2018; Li vd., 2019). Yine β-laktoglobulinden salınan peptidlerin, serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bunlardan biri olan, yüksek triptofan, tirozin ve metiyonin içeriğine sahip β-LG f (19e29), bütillenmiş hidroksi anisolden daha yüksek antioksidan aktivite ile karakterize edilmektedir (Hernandez-Ledesma vd., 2005). Ferrik indirgeyici antioksidan güç

(FRAP), bileşiğin ferrik demir (III)/ferrisiyanür kompleksini ferro demire (II) indirgeme yeteneğinin bir ölçümünü ifade etmektedir.

SSP, kazein, süt proteini ve hidrolizatların antioksidan kapasiteleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Antioksidan kapasite sonuçları değerlendirildiğinde hem farklı süt proteinleri fraksiyonları arasında hem de hidrolizatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). SSP'nin FRAP radikaline karşı gösterdiği antioksidan kapasitesi 63,00±1,73 –116,72±4,79 µmol TE/g arasında değişim göstermiştir.

Tablo 4.4 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının antioksidan kapasiteleri

Örnek	Enzim muamelesi	FRAP (µmol TE/g)	ABTS IC_{50} (µg/g)
SSP	Kontrol	$63,00±1,73^{dA}$	$10141,94±68,42^{aA}$
	Flavourzyme	$125,95±4,7^{aA}$	$1354,06±43,22^{bA}$
	Alkalaz	$82,53±2,42^{cA}$	$948,96±16,59^{cA}$
	Subtilisin	$102,07±4,25^{bA}$	$789,17±5,72^{dA}$
	Savinaz	$116,72±4,79^{aA}$	$782,11±16,33^{dA}$
Kazein	Kontrol	$17,33±0,54^{cB}$	$1770,26±18,10^{aB}$
	Flavourzyme	$39,65±0,29^{aB}$	$810,25±3,93^{bB}$
	Alkalaz	$40,80±0,78^{aB}$	$643,560±16,82^{dB}$
	Subtilisin	$39,63±0,54^{aB}$	$724,30±10,40^{cA}$
	Savinaz	$38,18±0,23^{bB}$	$675,89±31,96^{dB}$
Süt Proteini	Kontrol	$4,53±0,38^{bC}$	$603,20±10,73^{aB}$
	Flavourzyme	$11,97±1,75^{aC}$	$414,21±1,20^{cdC}$
	Alkalaz	$13,18±0,60^{aC}$	$461,57±9,71^{bC}$
	Subtilisin	$6,62±0,42^{bC}$	$439,16±8,74^{bcB}$
	Savinaz	$11,71±0,46^{aC}$	$387,68±7,3^{dC}$

FRAP (Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç) değerleri, µmol Trolox Eşdeğeri (TE)/g hidrolizat olarak ifade edilmiştir; ABTS (2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat), IC_{50} değeri (µg/mL) olarak verilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Hidroliz muamelesi SSP örneğinde FRAP radikalini süpürme gücünü önemli düzeyde geliştirmiş olmasına karşın parçalanma derecesi ile antioksidan gücü arasında doğru orantılı bir ilişki tespit edilememiştir. Ferrik demir (III)/ferrisiyanür kompleksinin ferro demire (II) indirgeme prensibine dayanan FRAP radikalinin inhibisyonunda flavourzyme hidrolizatı en yüksek etkinliği (125,95±4,7 µmol TE/g) göstermiş olmasına karşın daha yüksek derecede degradasyon sağlayan alkalaz, subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında azalma meydana geldiği saptanmıştır. SSP'nin ABTS radikaline karşı sergilediği antioksidatif etki hidroliz işlemi ile önemli düzeyde gelişmesiyle birlikte ilerleyen hidroliz derecesiyle güçlenmiştir. ABTS radikalinin %50'sini inhibe etmek için gerekli örnek miktarı olarak ifade edilen IC_{50} değerleri kontrol SSP için 10141,94±68,42 µg/g, flavourzyme hidrolizatında ise 1354,06±43,22 µg/g olarak hesaplanmıştır. Artan hidroliz derecesine paralel olarak alkalaz, subtilisin ve savinaz enzimleri hidrolizatlarının IC_{50} değerleri sırasıyla 948,96±16,59, 789,17±5,72 ve 782,11±16,33 µg/g olarak saptanmıştır.

Dryáková vd., (2010), SSP'nin alkalaz, flavourzyme, nötraz ve protameks olmak üzere 4 farklı mikrobiyal enzim kullanılarak 3 sa. hidroliz edildiği bir çalışmada hidroliz derecesinin ve enzim farklılığının antioksidan kapasiteleri üzerine olan etkisini araştırmışlardır. En yüksek degradasyonun meydana geldiği flavourzyme hidrolizatlarının (%35,2 HD) ABTS radikaline karşı gösterdiği antioksidan kapasitesi alkalaz hidrolizatlarına kıyasla çok daha düşük düzeyde kaldığını belirlemişlerdir. Bulgularımıza paralellik gösteren bu çalışmada da olduğu gibi SSP hidrolizatlarının antioksidan kapasitelerinde sadece parçalanma derecelerine bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Proteinlerin hidrolizi ile enzim- substrat kombinasyonunun anahtar parametre olduğunu gösteren farklı süpürme özellikleri sergileyen sistemlerde etkili olabilmektedir. Hidroliz ile geliştirilen antioksidan aktivitesi, peptid bağının veya peptidin yapısal konformasyonunda meydana gelen değişmelere bağlı olarak peptidde triptofan (Trp), Tyr ve Met kalıntılarının varlığıyla da ilişkilendirilebilmektedir.

FRAP radikaline karşı 17,33 µmol TE/g olan kazeinin antioksidan kapasitesi hidroliz derecesinden bağımsız bütün hidrolizat örneklerinde önemli düzeyde artış meydana getirmiştir ($p<0,05$). ABTS radikalini süpürmede gösterdikleri aktivite ise enzim

çeşitlerine göre farklılık göstermekle birlikte IC_{50} değerlerini azaltmıştır. ABTS radikalinde ilk absorbansa göre %50 inhibisyon etkisi meydana getiren kazeinin IC_{50} değeri (1770,26 µg/g) alkalaz ve savinaz hidrolizatlarında sırasıyla 643,56 ve 675,89 µg/g olarak hesaplanmıştır. Kazein hidrolizatları ve düşük moleküler ağırlıklı kazein hidrolizatları, fosfar içeriği eşit zenginleştirilmiş kazein fosfopeptidlerden (CPP) daha iyi peroksit radikali yakalama aktivitelerine sahiptir (Rival vd., 2001). Bu nedenle kazein hidrolizatlarının antioksidan özellikler, yalnızca fosfoseril kalıntıları tarafından metalleri şelatlamaya değil, aynı zamanda serbest radikallerin süpürülmesine de atfedilebilir. Kazein hidrolizatlarının serbest radikal temizleyiciler olarak hareket eden histidin, lizin, prolin ve tirozin konsantrasyonunun, kazeinofosfopeptidlerden yüksek olması hidrolizin antioksidan kapasitesinde sağladığı artışı açıklamaktadır (Díaz & Decker, 2004). Kazein hidrolizi, bivalent katyonları bağlayan, taşıyan ve biyoyararlanımı artıran ve ROS'u ortadan kaldıran β-kazomorfinlerin ve kazein fosfopeptidlerin oluşumunu sağlamaktadır. Kazeinofosfopeptidlerin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkileri muhtemelen metal şelasyonuna sebep olmaları ile açıklanabilir. Kazein hidrolizatlarının ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) analizinde belirli bir derecede elektron verme kapasitesi göstererek antioksidan kapasitesinde artış sağladığı bildirilmiştir (Díaz & Decker, 2004). Bulgular peptid konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa, radikal inhibisyonunun o kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimleriyle hidroliz edildikten sonra tüm kazein fraksiyonlarında (β-, κ- ve αs-kazeinler) antioksidan aktivitenin arttığını ve özellikle κ-kazein fraksiyonunda antioksidan aktivitesinde neredeyse üç kat artış sağladığı belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, sığır kazeini *Bifidobacterium longum* ile 24 sa. ve 48 sa. süre ile hidrolize edilmiş ve ABTS radikaline karşı en yüksek radikal indirgeme aktivitesinin <3 kDa fraksiyonunda sergilendiği bildirilmiştir (Chang vd., 2013). Kumar vd. (2016) deve sütü kazeinin alkalaz, kimotripsin ve papain enzimleri ile hidrolize ettikleri çalışmada farklı molekül ağırlığındaki fraksiyonların antioksidan kapasitelerini DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri ile incelemişlerdir. Sonuç olarak, DPPH radikalinde fraksiyonlardan bağımsız enzim türüne bağlı bir artışın gözlemlendiği ve en yüksek antioksidan kapasitesinin kimotripsin hidrolizatlarında tespit edildiği bulunmuştur. Aynı enzim hidrolizatlarının fraksiyonları (fraksiyonlanmamış hidrolizat, <1 kDa, 1–5 kDa, 5–10 kDa ve >10 kDa) arasında yapılan değerlendirilmede ise en yüksek antioksidan kapasitesinin bütün enzim örnekleri ve teknikler (DPPH, ABTS ve FRAP) için fraksiyonlara ayrılmamış kazein hidrolizatlarında

olduğu bildirilmiştir. Bu durum, fraksiyonlarına ayrılmamış hidrolizatta bulunan küçük ve büyük peptidlerin sinerjistik etkisiyle açıklanabilmektedir.

Bütün süt protein hidrolizatlarının antioksidan kapasitelerinin hidrolize olmamış süt protein örneklerine kıyasla çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4). Subtilisin enzim muamelesi süt protein hidrolizatının antioksidan kapasitesini geliştirmesine karşın bu katkı FRAP yöntemi için istatistiksel olarak anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir ($p>0,05$). Özellikle alkalaz enzim hidrolizatının FRAP radikaline karşı gösterdiği antioksidan kapasitesinde dikkate değer bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Diğer bir yöntem olan ABTS analizinde ise süt proteininde hidroliz muamelesinin etkisi IC_{50} değerlerindeki düşüşle gözlemlenmiştir. Kontrol süt proteininde 603,20 μg/g olan değer, degradasyonla azalmış ve en yüksek parçalanmanın meydana geldiği savinaz hidrolizatında en düşük değeri (387.68 μg/g) almıştır. Süt protein hidrolizatların için FRAP antioksidan kapasitesi serin tip enzimler (alkalaz, subtilisin ve savinaz) için hidroliz derecesinin artması ile genel olarak bir artış sergilemiş ve IC_{50} değerlerinde azalmaya neden olmuştur.

Daha küçük peptidler, daha küçük sterik engel nedeniyle serbest radikallerle hızla etkileşime girebilmektedir. Hidrolizin etkisiyle ortama salınan hidrofobik peptidler, oksidatif reaksiyonlarda proton sağlayan imidazol halkasının varlığı nedeniyle daha yüksek antiradikal süpürme aktivitesi sergilemektedir (Vásquez-Villanueva vd., 2016). Bu durum genel olarak hidroliz işlemi ile antioksidan kapasitesinde meydana gelen artışı açıklamaktadır. Tüm hidrolizatların daha yüksek antioksidan aktivitesine sahip olması, değişen moleküler boyut ve sekansa sahip daha yüksek peptid konsantrasyonundan ve ayrıca serbest radikalleri süpürmede sinerjistik etkilere sahip olabilecek peptidlerin yapısal fonksiyonelliğinden kaynaklanabilmektedir. Farklı enzimlere sahip hidrolizatlar için serbest radikal indirgeme aktivitesindeki fark, enzim özgüllüğüne ve sonuçta farklı amino asit bileşimine sahip hidrolizatların hidroliz derecesine bağlanabilir. Klompong vd., (2007) hidroliz derecesinin ve hidroliz için kullanılan enzimlerin protein hidrolizatlarının indirgeme gücünün belirlenmesinde hayati rol oynadığını bildirmiştir. Wu vd., (2003) protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesindeki farklılıkların spesifik peptid/amino asit kompozisyonuna atfedilebileceğini bildirmiştir. Bazı çalışmalar artan degradasyona bağlı olarak ortama salınan serbest amino asitlerin protein hidrolizatlarına göre antioksidan aktiviteyi azaltabileceğini göstermiştir, bu da proteinlerin birincil

yapısının antioksidan kapasitesinde önemli bir rol oynadığı göstermektedir (Kumar vd., 2016).

4.5.2 *In vitro* Antidiyabetik Aktivite

Tüm dünyada her yaştan bireyi etkileyen ve en önemli metabolik bozukluklardan biri olan diyabet, giderek yaygınlaşan bir hastalık haline gelmektedir (Jan vd., 2016). Gıda kaynaklı peptidlerin, özellikle süt kaynaklı biyoaktif peptidlerin, α-amilaz ve α-glikosidaz inhibisyonu yoluyla karbonhidrat parçalanma metabolizmasını ve şeker emilimini azaltarak ortaya çıkan antidiyabetik etkilere sahip olduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır (Jan vd., 2016; Acquah vd., 2020; Udenigwe vd., 2021). Daha küçük moleküler ağırlığa sahip biyoaktif peptidlerin *in vitro* antidiyabetik etkisinin daha güçlü ve in vitro biyoerişilebilirliğinin daha yüksek olabileceği bilinmektedir (Arshad vd., 2018).

SSP, kazein, süt proteini ve hidrolizatların *in vitro* antidiyabetik aktiviteleri α-glukozidaz ve α-amilaz enzim inhibisyonu analizleri ile tespit edilmiştir. α-amilaz enziminin inhibisyonu için SSP ve hidrolizatlarının IC_{50} değerleri 157,97 ile 97,47 µg/mL arasında değişim göstermiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Farklı enzimlerle muamele edilmiş farklı süt protein fraksiyonları ve hidrolizatlarının *in vitro* antidiyabetik aktivite kapasiteleri

Örnek	Enzim muamelesi	α-amilaz IC_{50} (µg/mL)	α-glukozidaz IC_{50} (µg/mL)
SSP	Kontrol	$157,97\pm1,43^{aA}$	$148,40\pm0,95^{aA}$
	Flavourzyme	$137,53\pm1,11^{bA}$	$123,58\pm0,51^{bA}$
	Alkalaz	$119,76\pm0,46^{cA}$	$100,81\pm1,29^{cA}$
	Subtilisin	$102,56\pm1,23^{dA}$	$87,81\pm1,33^{dA}$
	Savinaz	$97,47\pm0,12^{eA}$	$76,58\pm0,50^{eA}$
Kazein	Kontrol	$89,24\pm0,21^{aC}$	$79,87\pm0,16^{aC}$
	Flavourzyme	$71,62\pm0,42^{bC}$	$65,35\pm0,35^{bC}$
	Alkalaz	$52,57\pm0,17^{dC}$	$42,56\pm0,22^{eB}$
	Subtilisin	$58,03\pm0,37^{cC}$	$58,71\pm0,28^{cB}$
	Savinaz	$56,14\pm0,29^{cC}$	$52,83\pm0,19^{dB}$
Süt Proteini	Kontrol	$106,60\pm2,06^{aB}$	$129,30\pm1,15^{aB}$
	Flavourzyme	$98,69\pm0,62^{bB}$	$112,23\pm1,71^{bB}$
	Alkalaz	$91,05\pm0,91^{cB}$	$91,05\pm0,91^{cA}$
	Subtilisin	$81,09\pm0,58^{cB}$	$84,74\pm0,60^{dA}$
	Savinaz	$66,08\pm0,84^{dB}$	$70,72\pm0,49^{eA}$

α-glukosidaz ve α-amilaz inhibisyonu, IC_{50} değeri (µg/mL) olarak verilmiştir. SSP: Süt serum proteini. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırma sütunlar arasındadır, farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

En yüksek IC_{50} değeri hidrolize olmayan SSP örneğinde iken hidroliz muamelesi ile örneklerin IC_{50} değerleri azalmış ve flavourzyme, alkalaz, subtilisin ve savinaz örneklerinde sırasıyla 137,53, 119,76, 102,56 ve 97,47 µg/mL IC_{50} değerleri tespit

edilmiştir ($p<0,05$). SSP ve hidrolizatlarının diğer bir antidiyabetik özelliğinin belirlendiği α-glukozidaz enzim inhibisyonunda ise α-amilaz enzimine benzer bulgular elde edilmiştir. En yüksek IC_{50} değeri kontrol SSP örneğinde 148,40 µg/mL olarak hesaplanırken ilerleyen parçalanma derecesi ve buna bağlı olarak da antidiyabetik aktivitenin yükselmesiyle IC_{50} değerleri azalmış ve savinaz hidrolizatlarında en düşük değer (76,58 µg/mL) tespit edilmiştir. Kazein ve hidrolizatlarının antidiyabetik aktivitesini ifade eden IC_{50} değerleri ise α-amilaz enzimi için en yüksek 89,24 µg/mL ile kontrol kazein örneğinde belirlenmiştir. Parçalanma derecesinin artması dolayısıyla çok daha küçük molekül ağırlıklarına sahip peptid kompozisyonunun artmasına paralel olarak antiditabetik aktivite de yükselmiştir.

α-amilaz enziminde %50 inhibisyon sağlayan kazein hidrolizat miktarları flavourzyme, alkalaz, subtilisin ve savinaz enzim muameleleri ile sırasıyla 71,62, 52,57, 58,03 ve 56,4 µg/mL olarak bulunmuş ve enzim türüne göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir ($p<0,05$). α-glukozidaz inhibisyonuna karşı incelenen antidiyabetik aktivitede ise kazein örneği ve hidrolizatları α-amilaz enzimine karşı sergilediği benzer bir inhibisyon eğilimi sergilemiş ve en düşük aktiviteyi kontrol kazein numunesinde göstermiştir (IC_{50}: 79,87 µg/mL). Hidroliz ile birlikte en düşük parçalanmanın meydana geldiği flavourzyme kazein hidrolizatında IC_{50} değerinin 65,35 µg/mL'a kadar azaldığı saptanmıştır. Subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında sırasıyla 58,71 ve 52,83 µg/mL olan IC_{50} değeri en düşük alkalaz hidrolizatında tespit edilmiş ve en güçlü antidiyabetik aktiviteyi alkalaz hidrolizatı belirlenmiştir.

SSP ve kazein fraksiyonlarının her ikisini yapısında bulunduran süt proteini ve hidrolizatları ise antiditabetik aktivitede SSP ve kazein örneklerine benzer etki sağlamıştır. Süt protein ve hidrolizatlarının α-amilaz enzimi için IC_{50} değerleri 129,30 ile 70,72 µg/mL arasında değişim göstermiştir. Hidrolize olmayan süt proteini en düşük antidiyabetik etki sağlarken (IC_{50}:129,30 µg/mL), en yüksek hidroliz derecesinin olduğu savinaz hidrolizatında en güçlü antidiyabetik aktivite tespit edilmiştir. Süt protein ve hidrolizatlarının α-glukozidaz enzim inhibisyonuna karşı gösterdiği antidiyabetik aktivite hidroliz muamelesi ve enzim türüne bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim göstermiştir ($p<0,05$). Hidrolize tabi tutulmayan süt protein örneği α-glukozidaz inhibisyonunu 129,30 µg/mL IC_{50} değeri ile sağlarken, artan hidroliz derecesi ile antidiyabetik aktivite yükselmiş ve IC_{50} değerlerinde önemli düzeyde bir düşme saptanmıştır ($p<0,05$). Süt protein hidrolizatları arasında en düşük antidiyabetik aktivite

en düşük hidroliz derecesine sahip olan flavourzyme hidrolizatında (IC_{50}:112,23 µg/mL) tespit edilirken, en yüksek degradasyonun meydana geldiği subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında IC_{50} değerleri sırasıyla 84,74 ve 70,72 µg/mL'ye kadar düşüş göstermiştir. Kazein, SSP ve süt proteinleri ve hidrolizatları kendi aralarında kıyaslandığında, kazein ve hidrolizatlarının gerek α-amilaz ve gerekse α-glukozidaz enzimlerine karşı daha güçlü bir antidiyabetik aktivite sağladığı görülmektedir.

Kazein için subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında kontrol örneklerine ve en düşük hidroliz derecesinin meydana geldiği flavourzyme hidrolizatında IC_{50} değerleri önemli düzeyde azalma meydana getirmiştir. Buna karşın alkalaz hidrolizatı daha yüksek parçalanmanın belirlendiği savinaz ve subtilisin hidrolizatlarından çok daha düşük bir IC_{50} değeri ile α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerini inhibe etmiştir. Bazı çalışmaların (Ngoh & Gan, 2018) sonuçlarına benzerlik gösteren bu bulgular ilerleyen degradasyonla birlikte bazı substrat türlerinde kısa zincirli peptidlerin ve amino asitlerin inhibitör aktivitesinin kaybı ile açıklanabilir, bu da yüksek düzeyde hidrolizasyon sonucu daha fazla meydana gelebilmektedir. Biyoaktif peptidlerin karbonhidrat parçalayıcı enzimler üzerindeki inhibitör etkisi genel olarak peptidlerin moleküler boyutları ve sekansları ile ilişkili olsa da proteinin kaynağına ve türüne bağlı olarak farklı faktörlerin bu mekanizmada önemli bir rol oynayabileceği de bilinmektedir (Acquah vd., 2020).

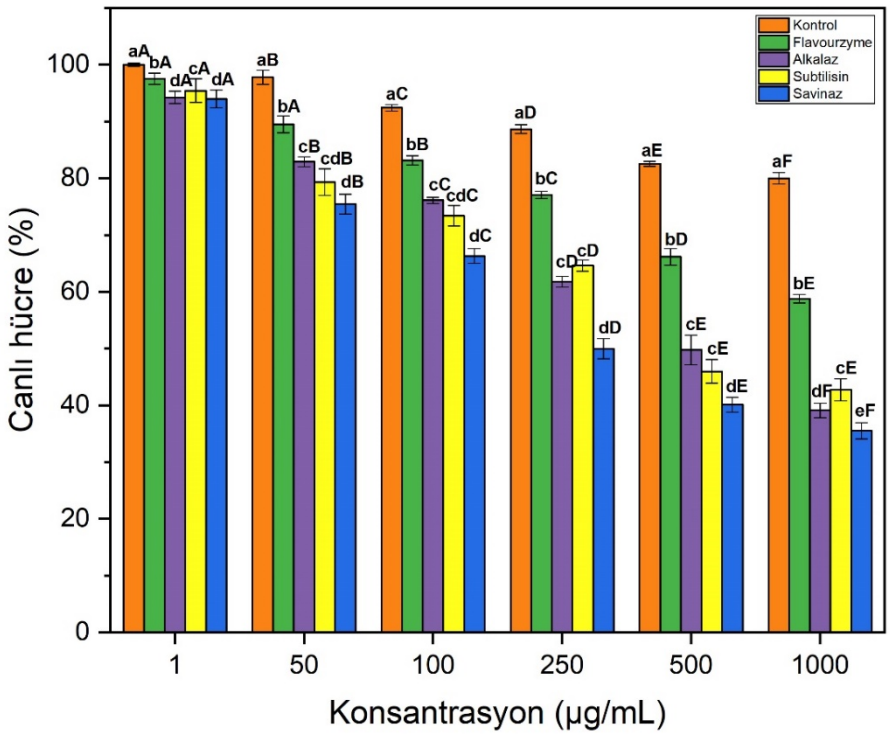
Fermentasyonun deve ve inek sütünün antidiyabetik karakteri üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, moleküler ağırlığı 3 kDa' nın altında olan peptid fraksiyonlarının 3-5 kDa'ya göre çok daha güçlü antidiyabetik kapasite gösterdiği bildirilmiştir (Moslehishad vd., 2013). Megrous vd. (2020), pH, sıcaklık, konsantrasyon gibi farklı hidroliz koşulları ile üretilen kazein hidrolizatlarının antidiyabetik ve antioksidan kapasitenin güçlendiğini belirtmiştir. Aynı çalışmada α-amilaz ve α-glukozidazın aktivitesini baskılayan mekanizma, Leu ve Pro gibi hidrofobik amino asitler açısından zengin peptid sekansı ile de ilişkilendirilmiştir.

Ngoh & Gan (2018), Leu1-Ser2-Ser3-Leu4-Glu5-Met6-Gly7-Ser8-Leu9-Gly10-Ala11-Leu12-Phe13-Val14-Cys15-Met16 peptid sekanslarına sahip Pinto fasulyesi hidrolizatlarının insan tükürüğü a-amilaz üzerinde en güçlü inhibe edici kapasiteyi gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.5.3 *In vitro* Sitotoksik Aktivite

SSP, kazein, süt proteini ve hidrolizatların *in vitro* sitotoksik etkileri, hastalıklı hücre hatları olarak insan kolorektal Caco-2 kanser (ATCC, #HTB-37) ve insan pankreas MIA PaCa-2 (ATCC, CRL-1420) kanser hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Bütün örneklerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek için ise insan embriyonik böbrek HEK-293 (ATCC, CRL-1573) hücre hattı kullanılmıştır.

Kazein ve hidrolizatlarının insan kolorektal Caco-2 kanser (ATCC, #HTB-37) hücresine karşı gösterdiği sitotoksik etki Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

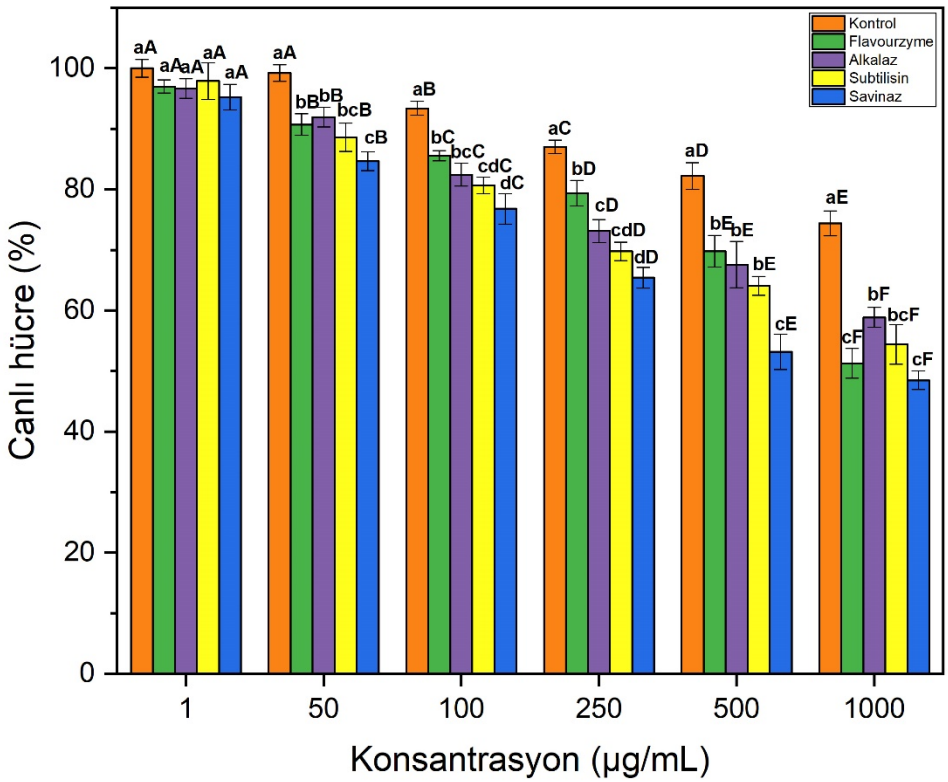


Şekil 4.13 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki in vitro sitotoksik aktivitesi

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Kazein ve hidrolizatlarının insan pankreas MIA PaCa-2 (ATCC, CRL-1420) kanser hücresine karşı gösterdiği sitotoksik etki Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Bütün hidrolizat örneklerinde uygulama dozunun artışı canlı hücre sayısında artan bir inhibisyon etkisi

meydana getirmiştir ($p<0,05$). Hidrolizatların 500 µg/mL' lik dozlar olarak uygulanması hücreler üzerinde anlamlı farklılıklar meydana getirerek canlı hücre sayısında önemli düzeyde azalma meydana getirmiştir. En yüksek düzeyde hücrenin inhibisyonunu sağlayan 1000 µg/mL'lik uygulama dozuyla alkalaz, subtilisin ve savinaz hidrolizatları için sırasıyla %58,87, %54,40 ve %48,46 canlı hücre tespit edilmiştir. Her iki kanser hücre hattı için en yüksek stotoksik aktivite savinaz hidrolizatının maksimum dozu olan 1000 µg/mL'lik uygulama dozlarında tespit edilmiştir.

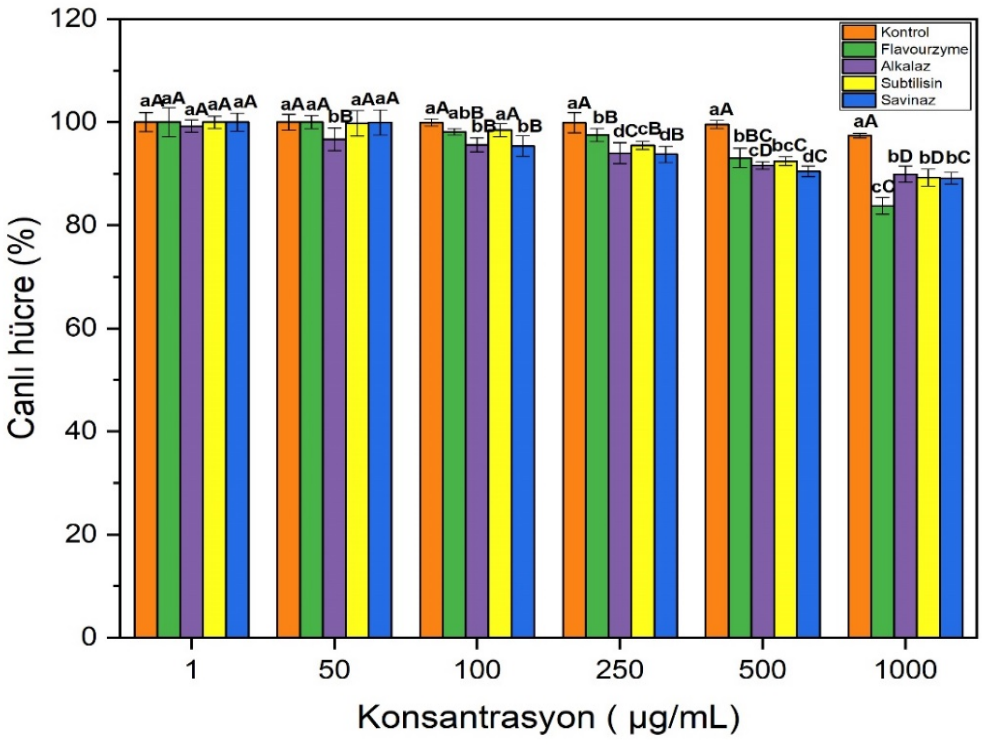


Şekil 4.14 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Kazein ve hidrolizatlarının insan embriyonik böbrek HEK-293 (ATCC, CRL-1573) hücre hattında gösterdiği sitotoksik etki Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Bütün kazein örneklerinin artan doza rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi sağlamadığı tespit edilmiştir ($p> 0,05$). 50 µg/mL'lik doz uygulamasıyla sadece alkalaz hidrolizatı anlamlı

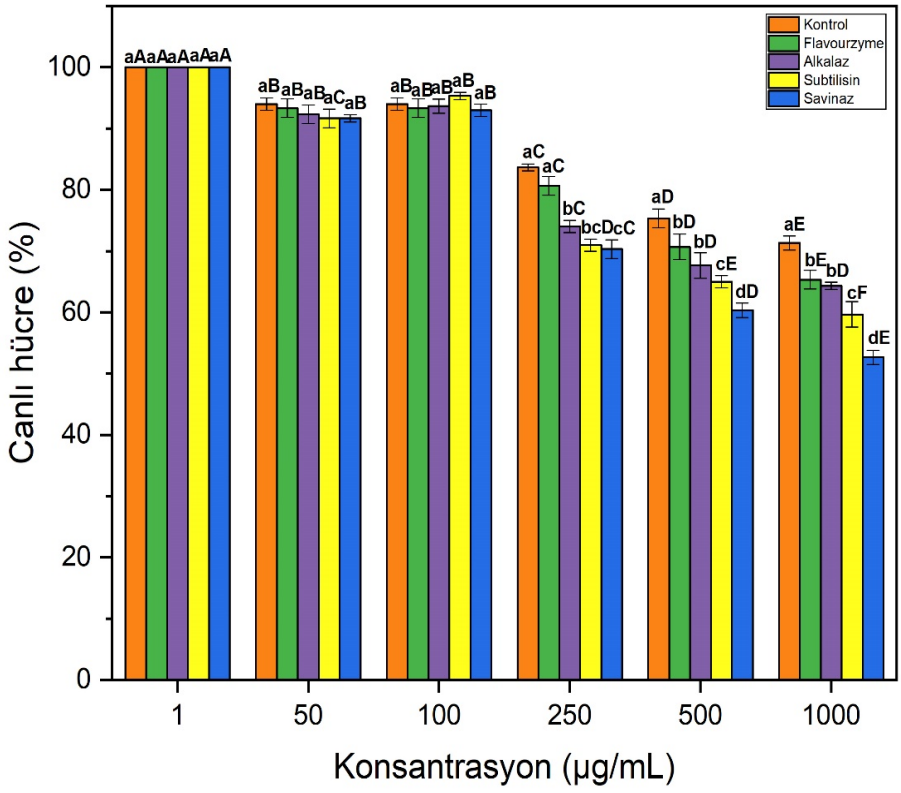
bir inhibisyon etkisi göstermiştir ($p<0,05$). Hidrolizatların sağlıklı hücre üzerindeki en güçlü sitotoksik etkisi, 1000 µg/mL'lik doz uygulamasında gözlenmiş ve alkalaz, subtilisin ve savinazdan oluşan serin tip enzimler için canlı hücre sayıları sırasıyla %89,92, %89,26 ve %89,12 olarak belirlenmiştir. Flavourzyme hidrolizatı için beklenilenin aksine daha güçlü bir sitotoksik etki gözlemlenirken en güçlü dozda %83,77 canlı hücre kaldığı saptanmıştır. Başta savinaz hidrolizat olmak üzere tüm hidrolizatlar, Caco-2 hücreleri üzerindeki yıkıcı etkilerine rağmen sağlıklı hücrede (HEK-293) önemli bir hasara neden olmamıştır. Örneğin, en yüksek uygulama dozunda, sağlıklı HEK-293 hücrelerinin canlılığı tüm hidrolizatlarda %83,77 ila %89,92 arasında değişmiştir. Kazein hidrolizatlarının sağlıklı ve kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkinliği, enzimin özgüllüğüne bağlı olarak biyoaktif peptid içeriklerine göre şekillenmiştir.



Şekil 4.15 Farklı enzimlerle muamele edilmiş kazein ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi.

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

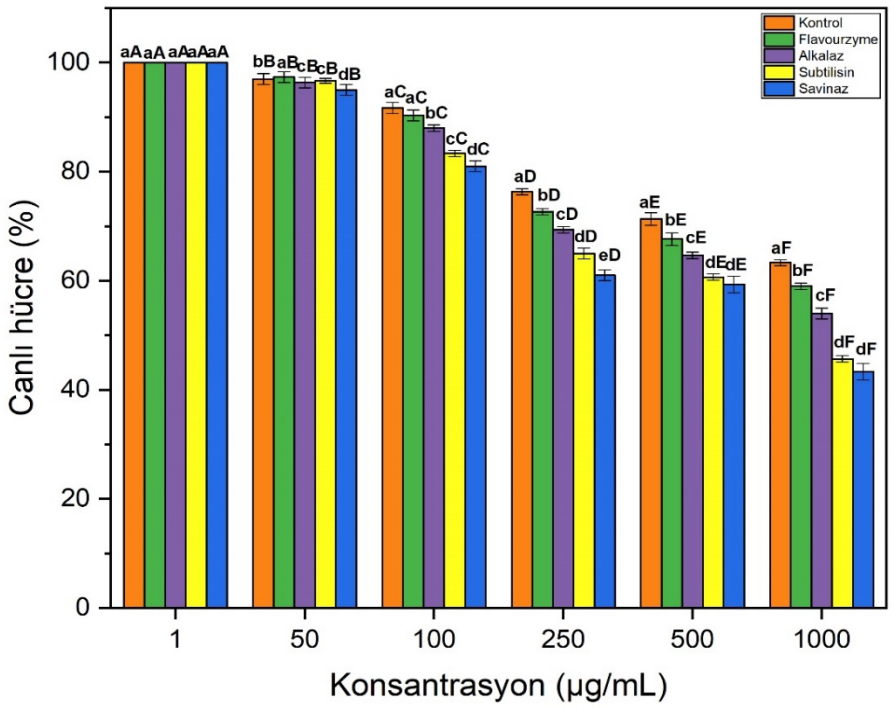
SSP ve hidrolizatlarının 1-1000 µg/mL doz uygulamalarının insan kolorektal Caco-2 kanser hücresinde meydana getirdiği inhibisyon Şekil 4.16'da verilmiştir. SSP hidrolizat örnekleri 100 µg/mL'lik uygulama dozu ve daha az olan dozlarda kanser hücresinde önemli bir sitotoksik etki meydana getirmemiştir ($p > 0,05$). 250 µg/mL şeklinde uygulanan dozlarda ise hidrolize edilmemiş SSP örneği de dahil olmak üzere bütün hidrolizatlarda önemli sayıda hücre üzerinde öldürücü etki sağlandığı saptanmıştır. Özellikle 500-1000 µg/mL'lik uygulama dozları kolorektal Caco-2 kanser hücresinde büyük oranda inhibisyon etksi meydana getirmiştir. En yüksek dozun uygulandığı Caco-2 kanser hücre hattında flavourzyme, alkalaz, subtilisin ve savinaz enzimleri için %65,33, %64,33, %59,67 ve %52,67 oranlarında hücrenin canlı kalabildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.16 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

SSP: Süt serum proteini. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

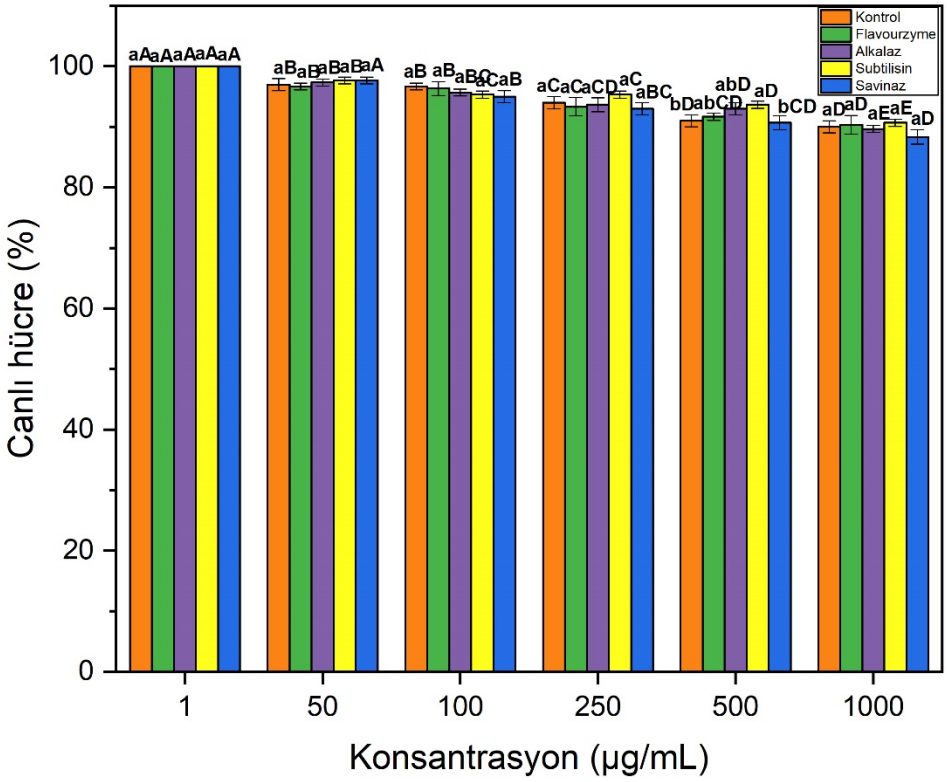
SSP ve hidrolizatlarının insan pankreas MIA PaCa-2 (ATCC, CRL-1420) kanser hücresine karşı gösterdiği sitotoksik aktivite Şekil 4.17'de verilmiştir. Bütün örneklerin 50 µg/mL olacak şekilde çok düşük dozlarda uygulanması bile 24 sa. inkübasyon sonunda MIA PaCa-2 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etki meydana getirmiştir ($p<0,05$). SSP hidrolizatlarının MIA PaCa-2 kanser hücre hattında enzim türüne bağlı olarak meydana getirdiği sitotoksik etki, özellikle 100 µg/mL ve daha üst konsantrasyonlu doz uygulamalarında gerçekleşmiştir ($p<0,05$). Parçalanmanın ilerlemesine paralel olarak insan pankreas hücresine karşı en yüksek sitoksik aktivitesi savinaz hidrolizatı göstermiş ve en yüksek dozunda (1000 µg/mL) yaklaşık %56,67 inhibisyon sağlamıştır. En güçlü inhibisyon etkisinde doza bağlı etki devam etmiş ve savinaz hidrolizatını sırasıyla subtilisin (%54,34) ve alkalaz (%46) enzim hidrolizatları izlemiştir.



Şekil 4.17 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

SSP: Süt serum proteini. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

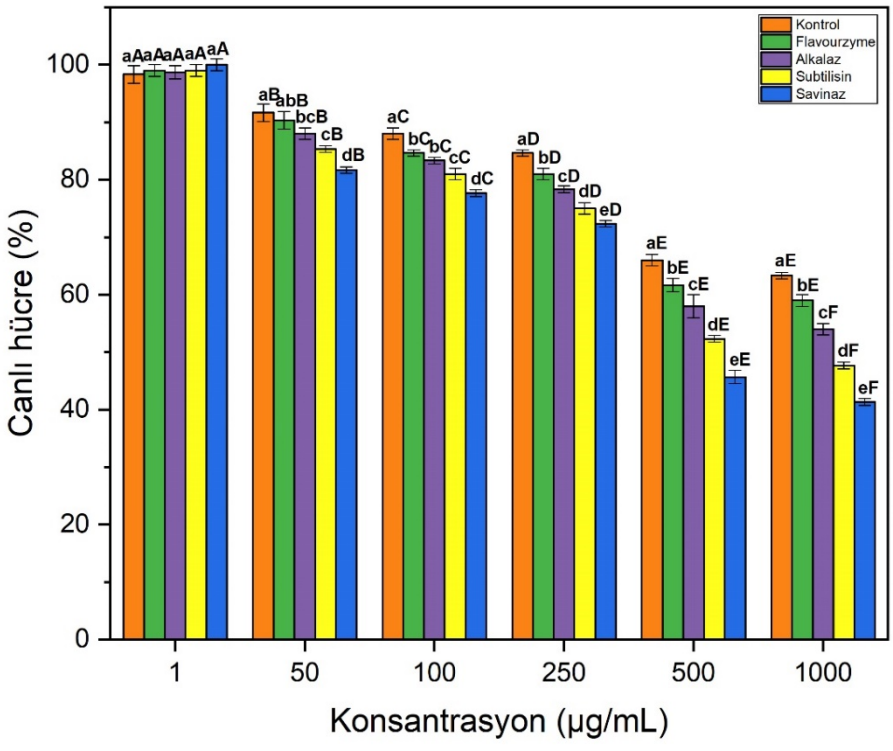
SSP ve hidrolizatlarının insan embriyonik böbrek HEK-293 (ATCC, CRL-1573) hücre hattındaki sitotoksik etki Şekil 4.18'de gösterilmiştir. SSP ve bütün hidrolizat örnekleri en düşük uygulama dozunda canlılık üzerine herhangi bir etki sağlamamıştır. Artan SSP ve hidrolizat konsantrasyonu (50 ve 100 µg/mL) sağlıklı hücre hattı olarak tercih edilen embriyonik böbrek hücrelerinde anlamlı bir değişim meydana getirememesine karşın ($p > 0,05$), 1000 µg/mL'lık en yüksek uygulama dozu canlılıkta düşükte olsa bir azalma sağlamıştır. Bütün SSP hidrolizatları arasında serin tip enzimler olan alkalaz ve savinaz en yüksek sitotoksik etkiyi gösterirken, maksimum doz kullanımında canlı hücreler üzerinde sırasıyla %10,33 ve %11,67 inhibisyon sağladıkları saptanmıştır.



Şekil 4.18 Farklı enzimlerle muamele edilmiş SSP ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

SSP: Süt serum proteini. Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

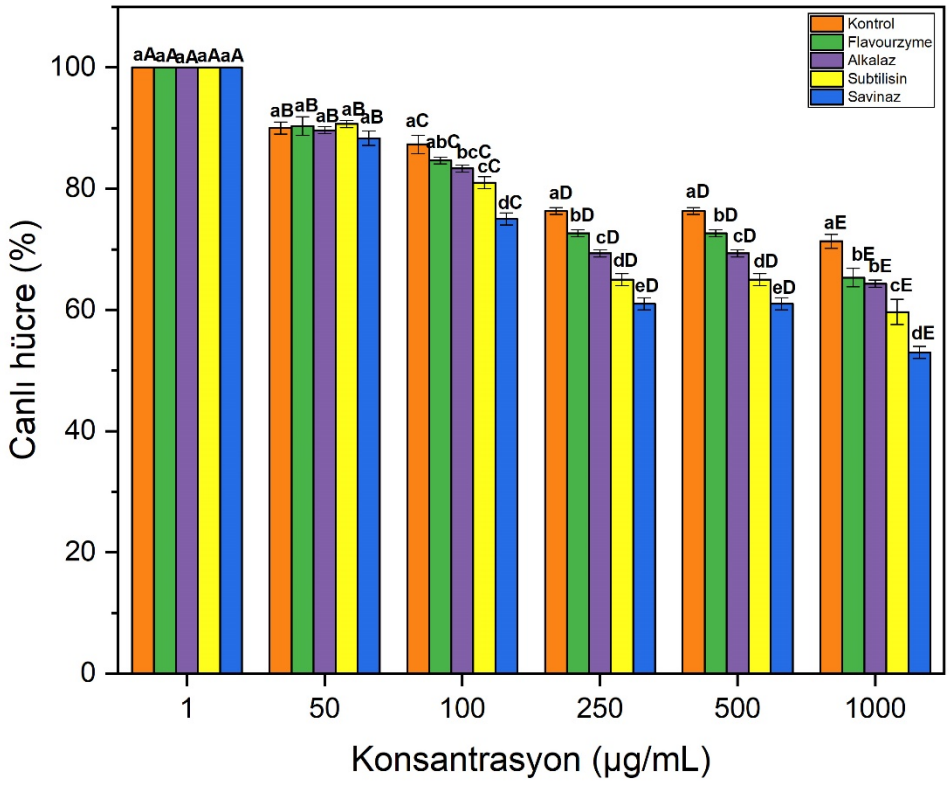
Süt protein ve hidrolizatlarının 1-1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki uygulama dozlarının insan kolorektal Caco-2 kanser hücresinde meydana getirdiği sitotoksik etki Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Süt proteini ve hidrolizatların en düşük konsantrasyonunda (1 µg/mL) örnek çeşidine bağlı olarak anlamlı farklıklar tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Bütün örneklerin 50 µg/mL ve üzerindeki uygulama dozları kolorektal kanser hücresinde öldürücü etkide bulunmuş ve bu enzim türüne bağlı olarak özellikle de subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında anlamlı farklıklar meydana geldiği saptanmıştır ($p<0,05$). 50, 100 ve 250 µg/mL'lik doz uygulamalarında parçalanmanın artışına paralel olarak ortalama %15-25 arasında inhibisyon sağlayan süt protein örnekleri, konsantrasyonun 500 ve 1000 µg/mL'a çıkmasıyla maksimum sitotoksik aktivite sağlamışlardır. Canlı kolorektal Caco-2 kanser hücre sayısı en yüksek doz uygulanması ile süt proteini için %63,3 olarak hesaplanırken en yüksek degradasyonun görüldüğü subtilisin ve savinaz hidrolizatlarında %47,7 ve 41,3'lere kadar azalmıştır.



Şekil 4.19 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının CaCo2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

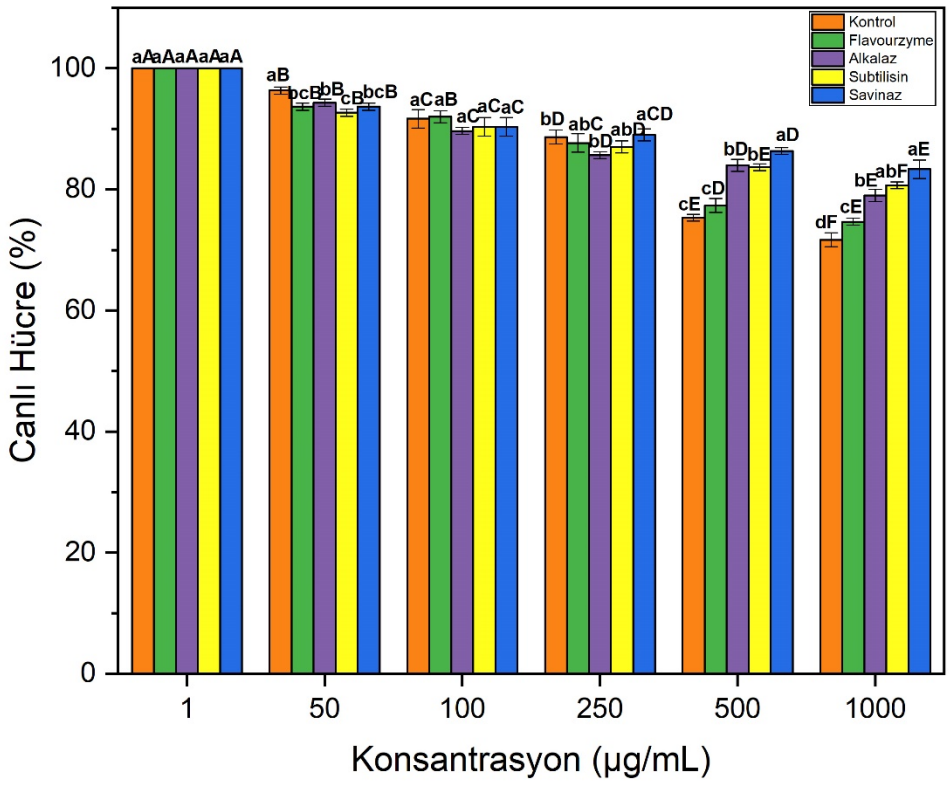
Süt protein ve hidrolizatlarının insan pankreas MIA PaCa-2 kanser hücresinde meydana getirdiği sitotoksik etki Şekil 4.20'de verilmiştir. Bütün örnekler için en düşük konsantrasyonda (1 µg/mL) herhangi bir sitotoksik etki meydana getirmemiştir ($p >0,05$). 50 µg/mL uygulama dozları ise pankreas kanser hücresinde öldürücü etkide bulunmasına rağmen bu değişim istatistiksek olarak anlamlı bulunmamıştır ($p >0,05$). Enzim türlerine göre hidrolizatların sitotoksik aktivitesi özellikle 250 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda gerçekleşmiş olmasına karşın 250 ve 500 µg/mL'lık uygulama dozlarında beklenilenin aksine önemli düzeyde bir canlı hücre inhibisyonu meydana getirmemiştir. İnsan pankreas MIA PaCa-2 kanser hücre hattında 1000 µg/mL olarak uygulanan bütün süt protein ve hidrolizat örnekleri maksimum inhibisyon kapasitesini sergilemiş ve savinaz hidrolizatı ile muamelede %53 canlı hücre tespit edilmiştir.



Şekil 4.20 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitesi**.**

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Süt protein örneklerinin insan embriyonik böbrek hücre hattına ait sitotoksik aktivite değerleri Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Örnek tipi ve konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısı %71,67 ve %96,33 arasında değişim göstermiştir. Örneklerin en düşük konsantrasyon (1 µg/mL) dışındaki bütün konsantrasyonlarda sağlıklı hücre hattında canlı inhibisyonu gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sitotoksik etki konsantrasyona bağlı olarak artmakla birlikte 250 µg/mL doz uygulamalarına kadar diğer hücre hatlarındaki gibi hidrolizatların yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Sağlıklı böbrek hücrelerine 500 ve 1000 µg/mL olarak uygulanan dozlarda ise beklenilenin aksine enzimatik hidrolize tabi tutulmayan süt proteini çok daha yüksek sitotoksik aktivite sergilemiştir. Benzer şekilde serin tip enzimlere kıyasla çok daha düşük düzeyde parçalanmanın meydana geldiği flavourzyme hidrolizatının sağladığı sitotoksik etki de çok daha yüksek ve istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Enzimatik modifikasyonun, süt proteinlerini parçalayan ve C- ve N-terminal pozisyonlarında benzersiz yapıya sahip amino asitleri içeren peptidleri ve geliştirilmiş biyoaktif özellikleri meydana getiren uygulamalardan biri olduğu bilinmektedir (Nath vd., 2020). Biyoaktif peptidler açısından zengin bir içeriğe sahip olan süt proteini hidrolizatlarının kanser üzerindeki inhibitör etkisi birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Song vd., 2017; El-Sayed & Awad, 2019).



Şekil 4.21 Farklı enzimlerle muamele edilmiş süt proteini ve hidrolizatlarının HEK-293 hücre hattı üzerindeki in vitro sitotoksik aktivitesi**.**

Farklı harfe sahip ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ($p<0,05$) Küçük harf, bir proteinin farklı proteazlarla muamele edilmiş hidrolizatları ve kontrolü arasındaki istatistiksel farkı ifade eder. Büyük harf ise farklı protein fraksiyonları arasındaki farkı temsil eder.

Peptidlerin *in vitro* sitotoksik aktivitesinin moleküler ağırlığa, peptid dizisine, yüzey yüküne, ikincil yapıya ve hidrofobikliğe bağlı olduğu rapor edilmiştir. Proteinlerle kıyasla hidrolizatların β-yapısında meydana gelen önemli değişim, antikanserojenik peptid oluşumunun proteinlerin β-sheet yapısındaki değişim ilişkisiyle açıklanabilmektedir (Sinthuvanich vd., 2012). β-sheet özelliklerine sahip peptidler, membranolitik aktivite göstererek hücre zarına bağlanır ve bu şekilde sitoplazmik zarın bozulmasına neden olmaktadır (Sinthuvanich vd., 2012). Çağın hastalığı olarak kabul edilen kanserin tedavisinde kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen ve normal hücreler için toksik olmayan protein ve peptidlerin üretilmesi ve kullanımı oldukça önemlidir. Sah vd. (2016), probiyotik yoğurttan saflaştırdıkları β-kazein türevi iki peptidin (193YQEPVLGPVRGPFPIIV209 ve 69SLPQNIPPLTQTPVVVPPF87) HT-29 kolon kanseri hücre hattının çoğalmasını inhibe ettiklerini (%41,49 ve %38,55) tespit

etmişlerdir. α, β ve κ-kazein proteinleri ve hidrolizatlarının bağışıklığı destekleyici ve tümör hücreleri üzerine olan öldürücü etkisi Bonuccelli vd. (2012)'nin çalışmalarında da kanıtlamış ve özellikle α-kazein fraksiyonlarının Met-1 hücre hattında, murin meme tümör hücrelerinde, insan meme kanseri hücre hattında MCF10A-H-Ras (G12V) ve MDA-MB-231 hücrelerinin *in vitro* inhibisyonunda, en etkili fraksiyonlar olduğunu bildirmişlerdir.

5
SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında kazein, süt serum proteini ve bu ikisinin karışımı olan süt proteini dört farklı ticari enzim kullanılarak hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik hidroliz işleminden sonra elde edilen hidrolizatların ve protein örneklerinin tekno-fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri karakterize edilmiştir. Kullanılan enzimlerin karakterlerine (endopeptidaz- ekzopeptidaz), bağlanma bölgelerine ve özellikle de enzim substrat özgünlüğüne göre hidroliz dereceleri önemli düzeyde farklılık göstermiştir. Süre, pH ve sıcaklık normlarına göre gerçekleştirilen enzimatik hidroliz prosesinde hidroliz süresinin artmasına paralel olarak hidroliz derecesi bütün örnekler için artış göstermiştir. Bütün protein örneklerinde en düşük aktiviteyi gösteren flavourzyme süt serum proteininde %4,9 (en düşük HD) parçalanma sağlamıştır. Bütün örneklerde en yüksek enzim aktivitesi savinaz ve subtilisin enzimlerinde tespit edilmiştir. Enzimatik hidrolize en duyarlı örnek türü kazein olurken, en yüksek hidroliz derecesi %26,12 ile kazein örneğinin savinaz hidrolizatında belirlenmiştir. Endo ve ekzopeptidaz karışımı niteliğinde olan flavourzyme ise bütün süt protein fraksiyonlarında beklenilenin aksine düşük aktivite göstermiştir. Süt serum proteini için farklı proteazlar diğer protein türlerine kıyasla hidroliz derecesinde çok daha büyük değişimler (%4,9- %25,6) meydana getirmiştir. Enzim aktivitesine bağlı olarak hidrolizatların molekül ağırlığında meydana gelen değişim ise SDS-PAGE jel elektroforezi ile gözlemlenmiştir. Hidrolizin derecesine paralel olarak çok daha küçük molekül ağırlıklı peptid ve aminoasit kompozisyonları açığa çıkmıştır. Molekül ağırlığındaki bu değişim kontrol olarak kabul edilen kazein, süt serum proteini ve süt proteinlerine karşın ilerleyen degradasyonla birlikte hidrolizatlarda üst bantların silinmesi ve yeni alt bantların oluşması ile şekillenmiştir. Özellikle savinaz ve subtilisin enzim hidrolizatlarında yüksek molekül ağırlığını ifade edilen üst bantlar neredeyse tamamen kaybolmuş ve çok daha küçük molekül ağırlıklı peptid kompozisyonu oluşumuna bağlı olarak yeni alt bantların varlığı tespit edilmiştir. Çalışma bulguları, hidroliz prosesinin proteinlerin teknolojik niteliklerinin geliştirilmesi ve farklı gıda-ürün uygulamalarında gerekli fonksiyonel özelliklerinin kazandırılmasında önemli düzeyde fayda sağladığını göstermektedir. Hidroliz işlemi ile modifiye edilen teknolojik karakterlerin özellikle hidroliz derecesine göre şekillendiği ve aşırı hidroliz prosesinin

bazı teknolojik karakterlerde zayıflamaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Birçok gıda uygulamasında proteinlerin ana ve yardımcı bileşen olarak kullanımına olanak tanıyan yağ bağlama kapasitesi özellikle süt serum proteini ve hidrolizatlarında en yüksek seviyede belirlenmiştir. Bazı enzim-substrat ilişkilerinde ortaya çıkan etkileşimler dışında genel olarak sınırlı hidroliz işlemi yağ bağlama kapasitesini güçlendirmiştir. En yüksek parçalanma sağlayan savinaz enzimi bütün hidrolizatın yağ bağlama kapasitelerinde diğer enzimlere kıyasla azalma meydana getirmiştir. Emülsiyon özelliklerini ifade eden emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri bütün protein örneklerinde hidroliz muamelesi ile artış göstermiş fakat bu artış hidroliz derecesi ile birlikte bir kolerasyon göstermemiştir. Yüzey yüklerini ifade eden zeta potansiyeli ise hidrolizle birlikte bütün örneklerde önemli bir değişim meydana getirmiştir. Kazein ve süt serum proteininde negatif yönde bir artışa sebep olan hidroliz işlemi süt proteininde pozitif yönde bir değişim sağlamıştır. Yüzey hidrofobisitesinde hidrolizle birlikte önemli bir düşüş meydana gelmiş ve alkalaz enzimi dışındaki hidrolizatlarda büyük bir azalma olduğu belirlenmiştir. Proteinlerin FTIR spektrumlarında özellikle de Amid I bölgesinde değişimlere sebep olan hidroliz, sekonder yapılarından α- heliks tabakada azalmaya ve β-sheet tabakada artışa neden olmuştur. Biyoaktif özellikler bakımından genel olarak hidroliz işleminin çok yönlü ve uygulanabilir bir modifikasyon yöntemi olduğu kanıtlanmıştır. Bütün protein türleri için enzimatik hidroliz muamelesi çok daha güçlü bir antioksidan kapasitesi sağlamıştır. Hidrolizatların ABTS radikalini indirgemede gösterdiği antioksidatif etki hidroliz derecesinin yükselmesine paralel olarak özellikle savinaz ve subtilisin hidrolizatlarında IC_{50} değerlerini önemli düzeyde azaltmıştır. Antidiyabetik aktivitenin göstergesi olarak değerlendirilen α-amilaz ve α-glukozidaz enzim inhibisyonunda da hidrolizat örnekleri hidrolize olmayan fraksiyonlara göre çok daha güçlü bir etki sağlamıştır. Enzimlerde %50 inhibisyon sağlayan örnek konsantrasyonunu ifade eden IC_{50} değerleri ilerleyen hidroliz derecesi ile azalmış ve en yüksek antidiyabetik aktivite bütün örnekler için en yüksek hidroliz derecesi sağlayan savinaz hidrolizatlarında saptanmıştır. Antidiyabetik aktiviteye benzer şekilde *in vitro* sitotoksik etki hidroliz derecesinin artmasıyla daha da güçlenmiştir. MIA PaCa2 ve CaCo2 kanser hücre hatlarında en düşük hidroliz derecesine sahip flavourzyme en düşük aktiviteyi gösterirken, sırasıyla savinaz ve subtilisin hidrolizatları kanser hücre hatlarında en düşük canlılık sağlamıştır.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz işleminin etkinliği protein tür ve yapısına göre değişirken tekno-fonksiyonel özelliklerin şekillenmesi özellikle de enzim-subtrat ilişkine bağlanmıştır. Farklı enzim muameleleri ile açığa çıkan peptid ve aminoasit profilinin karakterize edilmesi çalışmada enzim-substrat özgünlüğüne atfedilen teknolojik ve biyoaktif özelliklerin daha detaylı olarak incelenebilmesi açısından önem arz etmektedir. Peptid ve aminoasit profilinin karakterizasyonu aynı zamanda istenilen teknolojik veya biyoaktif özelliğin eldesine yönelik sentetik protein üretimine olanak sağlayacaktır. Protein hidrolizatlarının diğer bir önemli biyoaktif özelliği olarak değerlendirilen Anjiyotensin-I-Dönüştürücü Enzim (ACE) inhibisyon etkisinin araştırılması çalışmanın fonksiyonel karakterlerinin detaylandırılması açısından fayda sağlayacaktır. Hidrolizatların metabolomik yaklaşımlar çerçevesinde farklı *in vitro* sindirim modellerinde incelenmesi, biyoyararlanımlarının belirlenebilmesi ve bu bulguların farklı *in vivo* modellerde araştırılması hidrolizatların farklı tüketici grupları için nitelikli gıda takviyesi olarak kullanılabilirliğinin kanıtlanması açısından rasyonel sonuçlar sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.899200

Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2021). Reduction of milk protein antigenicity by enzymatic hydrolysis and fermentation. A review. Food Reviews International, 37(3), 276–295. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1701010

Acquah, C., Dzuvor, C. K. O., Tosh, S., & Agyei, D. (2020). Anti-diabetic effects of bioactive peptides: recent advances and clinical implications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 0(0), 1–14. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851168

Adamson, N. j., & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. Enzyme and Microbial Technology, 19(2), 202–207. https://doi.org/10.3109/01902148809115121

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014). Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. Food Hydrocolloids, 41, 169–177.

Adler-Nissen, J. (1986). Methods in food protein hydrolysis. In Enzymic hydrolysis of food proteins.

Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2013). Emulsifying property and antioxidative activity of cuttlefish skin gelatin modified with oxidized linoleic acid and oxidized tannic acid. Food and Bioprocess Technology, 6(4), 870–881. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0636-1

Agarwal, A., Pathera, A. K., Kaushik, R., Kumar, N., Dhull, S. B., Arora, S., & Chawla, P. (2020). Succinylation of milk proteins: Influence on micronutrient binding and functional indices. Trends in Food Science and Technology, 97(January), 254–264. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.016

Agarwal, S., Beausire, R. L. W., Patel, S., & Patel, H. (2015). Innovative uses of milk protein concentrates in product development. Journal of Food Science, 80(S1), A23–A29. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12807

Agboola, S. O., Singh, H., Munro, P. A., Dalgleish, D. G., & Singh, A. M. (1998). Destabilization of oil-in-water emulsions formed using highly hydrolyzed whey proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(1), 84–90. https://doi.org/10.1021/jf970365b

Ahn, W. S., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2005). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant Escherichia coli. International Display Manufacturing Conference and Exhibition, IDMC'05, 119–122.

Ahren, B., Gomis, R., Standl, E., Mills, D., & Schweizer, A. (2004). Twelve- and 52-week efficacy of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor LAF237 in metformin-treated patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, 27(12), 2874–2880. http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L39565052%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2337/diacare.27.12.2874

Aider, M., Djenane, D., & Ounis, W. B. (2012). Amino acid composition, foaming, emulsifying properties and surface hydrophobicity of mustard protein isolate as affected

by pH and NaCl. International Journal of Food Science and Technology, 47(5), 1028–1036. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02937.x

Akhavan, T., Luhovyy, B. L., Panahi, S., Kubant, R., Brown, P. H., & Anderson, G. H. (2014). Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. Journal of Nutritional Biochemistry, 25(1), 36–43. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.012

Albenzio, M., Santillo, A., Ciliberti, M. G., Figliola, L., Caroprese, M., Marino, R., & Polito, A. N. (2016). Milk from different species: Relationship between protein fractions and inflammatory response in infants affected by generalized epilepsy. Journal of Dairy Science, 99(7), 5032–5038. https://doi.org/10.3168/JDS.2015-10704

Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. International Journal of Food Microbiology, 167(3), 303–309. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.09.006

Al-Shamsi, K. A., Mudgil, P., Hassan, H. M., & Maqsood, S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in *in vitro* and in food model systems. Journal of Dairy Science. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13194

Alting, A. C., & van de Velde, F. (2012). Proteins as clean label ingredients in foods and beverages. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings, 197–211. https://doi.org/10.1533/9780857095725.1.197

Arai, S., Maeda, A., Matsumura, M., Hirao, N., & Watanabe, M. (1986). Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. Agricultural and Biological Chemistry, 50(11), 2929–2931. https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867855

Arshad, N., Siow, H. L., Ngoh, Y. Y., Sofian, N. A. H. S., & Gan, C. Y. (2018). Enzyme and bioactive peptides-a strategy for discovery and identification of antihypertensive peptides. In Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00020-7

Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010). Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. Amino Acids, 38(5), 1533–1539. https://doi.org/10.1007/s00726-009-0377-x

Athira, S., Mann, B., Sharma, R., & Kumar, R. (2013). Ameliorative potential of whey protein hydrolysate against paracetamol-induced oxidative stress. Journal of Dairy Science, 96(3), 1431–1437. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6080

Attaallah, W., Yılmaz, A. M., Erdoğan, N., Yalçın, A. S., & Aktan, A. Ö. (2012). Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. Pathology & Oncology Research, 18, 817-822.

Azrin, N. A. M., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Oslan, S. N., & Noor, N. D. M. (2022). Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. Biotechnology and Applied Biochemistry, 69(6), 2599–2616. https://doi.org/10.1002/bab.2309

Bamdad, F., Shin, S. H., Suh, J. W., Nimalaratne, C., & Sunwoo, H. (2017). Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high

hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. Molecules, 22(4). https://doi.org/10.3390/molecules22040609

Banach, J. C., Lin, Z., & Lamsal, B. P. (2013). Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. Lwt, 54(2), 397–403. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.023

Bao, C., Chen, H., Chen, L., Cao, J., & Meng, J. (2016). Comparison of ACE inhibitory activity in skimmed goat and cow milk hydrolyzed by alcalase, flavourzyme, neutral protease and proteinase K. Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology. https://doi.org/10.1515/aucft-2016-0006

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. In Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2007.06.004

Bekiroglu, H., Bozkurt, F., Karadag, A., Ahhmed, A. M., & Sagdic, O. (2022). The effects of different protease treatments on the techno-functional, structural, and bioactive properties of bovine casein. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 0(0), 1–12. https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033988

Belatik, A., Kanakis, C. D., Hotchandani, S., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahia, H. A. (2012). Locating the binding sites of retinol and retinoic acid with milk β-lactoglobulin. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 30(4), 437–447. https://doi.org/10.1080/07391102.2012.682209

Bencini, M. C. (1986). Functional Properties of Drum-Dried Chickpea (Cicer arietinum L.) Flours. Journal of Food Science. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13849.x

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Bezerra, J. de A., Sanches, E. A., Lamarão, C. V., & Campelo, P. H. (2022). Ultrasound and effect on the surface hydrophobicity of proteins: a meta-analysis. International Journal of Food Science and Technology, 57(7), 4015–4026. https://doi.org/10.1111/ijfs.15774

Bielecka, M., Cichosz, G., & Czeczot, H. (2022). Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates - A review. International Dairy Journal, 127. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105208

Bin, P., Huang, R., & Zhou, X. (2017). Oxidation resistance of the sulfur amino acids: Methionine and cysteine. BioMed Research International, 2017. https://doi.org/10.1155/2017/9584932

Boland, M. (2011). Whey proteins. Alternative Medicine Review, 13(4), 30–55. https://doi.org/10.1533/9780857093639.30

Bonuccelli, G., Castello-Cros, R., Capozza, F., Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Tsirigos, A., Xuanmao, J., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Lisanti, M. P., & Sotgia, F. (2012). The milk protein α-casein functions as a tumor suppressor via activation of STAT1 signaling, effectively preventing breast cancer tumor growth and metastasis. Cell Cycle, 11(21), 3972–3982. https://doi.org/10.4161/cc.22227

Borad, S. G., Kumar, A., & Singh, A. K. (2017). Effect of processing on nutritive values of milk protein. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(17), 3690–3702. https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1160361

Bottani, M., Cattaneo, S., Pica, V., Stuknytė, M., De Noni, I., & Ferraretto, A. (2020). İn vitro antioxidant properties of digests of hydrolyzed casein and caseinophosphopeptide preparations in cell models of human intestine and osteoblasts. Journal of Functional Foods, 64, 103673. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103673

Bougatef, A. (2013). Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications- Comprehensive review. Journal of Cleaner Production, 57, 257–265. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.005

Bozkurt, F., Bekiroglu, H., Dogan, K., Karasu, S., & Sagdic, O. (2021). Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases. Lwt, 149(March), 111787. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111787

Bu, G., Luo, Y., Zhang, Y., & Chen, F. (2010). Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(12), 2015–2020. https://doi.org/10.1002/jsfa.4046

Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2012). Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(22), 5644–5651. https://doi.org/10.1021/jf301409n

Butu, M., Butnariu, M., Rodino, S., & Butu, A. (2014). Study of zingiberene from Lycopersicon Esculentum fruit by mass spectometry. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 9(3), 935–941.

Cabrera-Padilla, R. Y., Pinto, G. A., Giordano, R. L. C., & Giordano, R. C. (2009). A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. Process Biochemistry, 44(3), 269–276. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.019

Caessens, P. W. J. R., Gruppen, H., Slangen, C. J., Visser, S., & Voragen, A. G. J. (1999). Functionality of β-casein peptides: Importance of amphipathicity for emulsion-stabilizing properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(5), 1856–1862. https://doi.org/10.1021/jf9809479

Carpenter, K. J., & Duckworth, J. (1950). The nutritive value of herring 'alkali-reduction' meal for chicks. The Journal of Agricultural Science, 40(1–2), 44–49. https://doi.org/10.1017/S0021859600045482

Castro, G. A., Maria, D. A., Bouhallab, S., & Sgarbieri, V. C. (2009). *In vitro* impact of a whey protein isolate (WPI) and collagen hydrolysates (CHs) on B16F10 melanoma cells proliferation. Journal of Dermatological Science, 56(1), 51–57. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.06.016

Chang, O. K., Seol, K. H., Jeong, S. G., Oh, M. H., Park, B. Y., Perrin, C., & Ham, J. S. (2013). Casein hydrolysis by Bifidobacterium longum KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. Journal of Dairy Science, 96(9), 5544–5555. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6687

Chawla, P., Bhandari, L., Sadh, P. K., & Kaushik, R. (2017). Impact of solid-state fermentation (aspergillus oryzae) on functional properties and mineral bioavailability of black-eyed pea (vigna unguiculata) seed flour. Cereal Chemistry, 94(3), 437–442. https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-16-0128-R

Chobert, J. M, Bertrand-Harb, C., Dalgalarrondo, M., & Nicolas, M. -G. (1989). Solubility and Emulsifying Properties of Betacasein Modified Enzymatically By Trypsin.

Journal of Food Biochemistry, 13(5), 335–352. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1989.tb00403.x

Clemente, A. (2000). _Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends in Food Science & Technology, 13(3), 270–276. https://doi.org/10.1097/00005176-199110000-00006

Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. Food Chemistry: Molecular Sciences, 3, 100047. https://doi.org/10.1016/J.FOCHMS.2021.100047

Cui, Q., Sun, Y., Cheng, J., & Guo, M. (2022). Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. Food Chemistry, 366(March 2021), 130711. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130711

Cui, Q., Sun, Y., Zhou, Z., Cheng, J., & Guo, M. (2021). Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties and solubility and bitterness of milk protein hydrolysates. Foods, 10(10). https://doi.org/10.3390/foods10102462

Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M. S., Di Patti, M. C. B., Valenti, P., & Musci, G. (2020). Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. Biomolecules, 10(3), 1–26. https://doi.org/10.3390/biom10030456

Dakin, H. D., & Dudley, H. W. (1913). the Racemization of Proteins and Their Derivatives Resulting From Tautomeric Change. Part Ii. Journal of Biological Chemistry, 15(2), 263–269. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)88525-8

da Silva, D. F., Ahrne, L., Larsen, F. H., Hougaard, A. B., & Ipsen, R. (2018). Physical and functional properties of cheese powders affected by sweet whey powder addition before or after spray drying. Powder Technology, 323, 139-148.

Day, L., Cakebread, J. A., & Loveday, S. M. (2022). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. Trends in Food Science and Technology, 119(December 2021), 428–442. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020

de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. Food and Bioproducts Processing. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.004

de Castro, R. J. S., Bagagli, M. P., & Sato, H. H. (2015). Improving the functional properties of milk proteins: Focus on the specificities of proteolytic enzymes. In Current Opinion in Food Science. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.004

de la Hoz, L., Nunes da Silva, V. S., Morgano, M. A., & Pacheco, M. T. B. (2014). Small peptides from enzymatic whey hydrolyzates increase dialyzable iron. International Dairy Journal, 38(2), 145–147. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.12.009

Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H., & Feng, F. (2016). Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from Aspergillus usamii. PLoS ONE, 11(7), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160101

Díaz, M., & Decker, E. A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26), 8208–8213. https://doi.org/10.1021/jf048869e

Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. Journal of Dairy Science, 92(4), 1387–1397. https://doi.org/10.3168/JDS.2008-1791

Doucet, D., Gauthier, S. F., & Foegeding, E. A. (2001). Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. Journal of Food Science, 66(5), 711–715. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04626.x

Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. J. T. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. European Food Research and Technology, 230(6), 865–874. https://doi.org/10.1007/s00217-010-1231-9

Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., & Wang, H. (2022). Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. Lwt, 159(February), 113257. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257

Duan, C. C., Yang, L.-J., Li, A. L., Zhao, R., & Huo, G. C. (2014). Effects of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of whey protein concentrates. Iran J Allergy Asthma Immunol, 13(4), 231–239.

Dunne, J., Evershed, R. P., Salque, M., Cramp, L., Bruni, S., Ryan, K., Biagetti, S., & Di Lernia, S. (2012). First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium bc. Nature, 486(7403), 390–394. https://doi.org/10.1038/nature11186

El-Bakry, M. (2011). Functional and Physicochemical properties of casein and its Use in Food and Non-Food Industrial Applications. Chemical Physics Research Journal, 4(3), 1–15.

El-Sayed, M., & Awad, S. (2019). Milk bioactive peptides: antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic activities. Advances in Biochemistry, 7(1), 22. https://doi.org/10.11648/j.ab.20190701.15

Emmett Grames. (2020). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. 14. https://all3dp.com/2/fused-deposition-modeling-fdm-3d-printing-simply-explained/

Estévez, N., Fuciños, P., Sobrosa, A. C., Pastrana, L., Pérez, N., & Luisa Rúa, M. (2012). Modeling the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptide mixtures obtained from cheese whey hydrolysates using concentration-response curves. Biotechnology Progress, 28(5), 1197–1206. https://doi.org/10.1002/btpr.1587

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuyse, O., Akkermans, P. M. M. G., Bailey, D., Andeescu, R. R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M., Biçakci, E., … Burton, M. M. (2008). Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. Nature, 455(7212), 528–531. https://doi.org/10.1038/nature07180

Farrell, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M., & Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? Current Opinion in

Colloid & Interface Science, 11(2–3), 135–147. https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2005.11.005

Feng, Z., Li, L., Zhang, Y., Li, X., Liu, C., Jiang, B., Xu, J., & Sun, Z. (2019). Formation of whey protein isolate nanofibrils by endoproteinase GluC and their emulsifying properties. Food Hydrocolloids, 94(October 2018), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.004

Flanagan, J., & FitzGerald, R. J. (2002). Functionality of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate. International Dairy Journal, 12(9), 737–748. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00067-5

Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., & Wishart, D. S. (2019). Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(17), 4897–4914. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00204

Fountoulakis, M., & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A, 826, 109–134.

Ganote, C. E., Peterson, D. R., & Carone, F. A. (1974). The nature of D serine induced nephrotoxicity. American Journal of Pathology, 77(2), 269–282.

García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F. J., Ruiz-Quesada, C., Pérez-Morilla, A. I., Martínez-Agustín, O., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2017). Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(1), 299–308. https://doi.org/10.1002/jsfa.7731

García-Nebot, M. J., Cilla, A., Alegría, A., & Barberá, R. (2011). Caseinophosphopeptides exert partial and site-specific cytoprotection against H2O2-induced oxidative stress in Caco-2 cells. Food Chemistry, 129(4), 1495–1503. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.129

Geirsdottir, M., Sigurgisladottir, S., Hamaguchi, P. Y., Thorkelsson, G., Johannsson, R., Kristinsson, H. G., & Kristjansson, M. M. (2011). Enzymatic hydrolysis of blue whiting (*Micromesistius poutassou*); functional and bioactive properties. Journal of Food Science. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01877.x

Ghosh, B. C., Prasad, L. N., & Saha, N. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. Journal of Food Science and Technology, 54(6), 1476–1483. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z

Gilbert, E. R., Wong, E. A., & Webb, K. E. (2008). Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. Journal of Animal Science, 86(9), 2135–2155. https://doi.org/10.2527/jas.2007-0826

Gilliland, G. L., & Teplyakov, A. (2011). Structural calcium (Trypsin, Subtilisin). Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, 1–14. https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0522

Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J. M., & Raussens, V. (2006). Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. Biophysical Journal, 90(8), 2946–2957. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072017

Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., & Yıldırım, M. (2010). Süt Serum Proteinleri ve Türevlerinin Biyolojik ve Fizyolojik Aktiviteleri. Akademik Gıda, 8(1), 23–31.

Hammershøj, M., Nebel, C., & Carstens, J. H. (2008). Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. Food Research International, 41(5), 522–531. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.03.004

Haque, E., Bhandari, B. R., Gidley, M. J., Deeth, H. C., Møller, S. M., & Whittaker, A. K. (2010). Protein conformational modifications and kinetics of water-protein interactions in milk protein concentrate powder upon aging: Effect on solubility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(13), 7748–7755. https://doi.org/10.1021/jf1007055

Haug, I. J., & Draget, K. I. (2011). Gelatin. Handbook of Food Proteins, 92–115. https://doi.org/10.1533/9780857093639.92

He, W., Lu, Y., Qi, J., Chen, L., Hu, F., & Wu, W. (2013). Nanoemulsion-templated shell-crosslinked nanocapsules as drug delivery systems. International Journal of Pharmaceutics, 445(1–2), 69–78. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.072

Heck, J. M. L., Schennink, A., Van Valenberg, H. J. F., Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W., Van Arendonk, J. A. M., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. Journal of Dairy Science, 92(3), 1192–1202. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1208

Henderson, L. M., & Snell, E. e. (1948). A uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms. Journal of Biological Chemistry, 172(1), 15–29. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35607-2

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α-lactalbumin and β-lactoglobulln. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(3), 588–593. https://doi.org/10.1021/jf048626m

Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Advances in Colloid and Interface Science, 165(1), 23–35. https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001

Higuera-Barraza, O. A., Del Toro-Sanchez, C. L., Ruiz-Cruz, S., & Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. Ultrasonics Sonochemistry, 31, 558–562. https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.02.007

Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H., & Zhou, K. (2009). Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. Food Chemistry, 117(3), 438–443. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.040

Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods1. Journal of Dairy Science, 96(10), 6127–6146. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831

Horne, D. S. (2020). Casein micelle structure and stability. Milk Proteins: From Expression to Food, 213–250. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00006-2

Hou, J., Liu, Z., Cao, S., Wang, H., Jiang, C., Hussain, M. A., & Pang, S. (2018). Broad-Spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity against human cells of a peptide derived from bovine αS1-casein. Molecules, 23(5), 1–15. https://doi.org/10.3390/molecules23051220

Hu, Y., He, C., Zhang, M., Zhang, L., Xiong, H., & Zhao, Q. (2020). Inhibition from whey protein hydrolysate on the retrogradation of gelatinized rice starch. Food Hydrocolloids, 108(March). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105840

Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2018). The caseins: Structure, stability, and functionality. Proteins in Food Processing, Second Edition, 49–92. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8

Jan, F., Kumar, S., & Jha, R. (2016). Effect of boiling on the antidiabetic property of enzyme treated sheep milk casein. Veterinary World, 9(10), 1152–1156. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1152-1156

Jędrychowski, L., & Wróblewska, B. (1999). Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation. Food and Agricultural Immunology, 11(1), 91–99. https://doi.org/10.1080/09540109999951

Jeong, E. W., Park, G. R., Kim, J., Baek, Y., Go, G. W., & Lee, H. G. (2022). Whey Proteins-Fortified Milk with Adjusted Casein to Whey Proteins Ratio Improved Muscle Strength and Endurance Exercise Capacity without Lean Mass Accretion in Rats. Foods, 11(4). https://doi.org/10.3390/foods11040574

Kankanamge, R., Jeewanthi, C., Lee, N. K., Lee, S. K., Yoon, Y. C., & Paik, H. D. (2015). Physicochemical characterization of hydrolysates of whey protein concentrates for their use in nutritional beverages. Food Science and Biotechnology, 24(4), 1335–1340. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0171-3

Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., McNaughton, D., & Augustin, M. A. (2007). FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. Vibrational Spectroscopy, 44(2), 375–381. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2007.03.006

Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2018). Whey proteins. Proteins in Food Processing, Second Edition, 93–126. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X

Kilara, A., & Panyam, D. (2003). Peptides From Milk Proteins and Their Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(6), 607–633. https://doi.org/10.1080/10408690390251138

Kim, J. H., Jang, H. J., Cho, W. Y., Yeon, S. J., & Lee, C. H. (2020). *In vitro* antioxidant actions of sulfur-containing amino acids. Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 1678–1684. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.036

Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. Trends in Food Science and Technology, 105(June), 261–272. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012

Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition. https://doi.org/10.1080/10408397609527208

Kishta, O. A., Iskandar, M., Dauletbaev, N., Kubow, S., & Lands, L. C. (2013). Pressurized whey protein can limit bacterial burden and protein oxidation in Pseudomonas aeruginosa lung infection. Nutrition, 29(6), 918–924. https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.009

Kleber, N., Weyrich, U., & Hinrichs, J. (2006). Screening for lactic acid bacteria with potential to reduce antigenic response of β-lactoglobulin in bovine skim milk and sweet

whey. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 7(3), 233–238. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.12.005

Klein, N., Zourari, A., & Lortal, S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products - Comparison with several dairy bacteria. International Dairy Journal, 12(10), 853–861. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00081-X

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016

Kong, B., Peng, X., Xiong, Y. L., & Zhao, X. (2012). Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. Food Chemistry, 135(2), 540–547. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.122

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods. https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007

Kostadinović Veličkovska, S., Brühl, L., Mitrev, S., Mirhosseini, H., & Matthäus, B. (2015). Quality evaluation of cold-pressed edible oils from Macedonia. European Journal of Lipid Science and Technology, 117(12), 2023–2035. https://doi.org/10.1002/ejlt.201400623

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. https://doi.org/10.1080/10408690091189266

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from atlantic salmon (Salmo salar) pyloric caeca. Journal of Food Biochemistry. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00694.x

Kristoffersen, K. A., Afseth, N. K., Böcker, U., Lindberg, D., de Vogel-van den Bosch, H., Ruud, M. L., & Wubshet, S. G. (2020). Average molecular weight, degree of hydrolysis and dry-film FTIR fingerprint of milk protein hydrolysates: Intercorrelation and application in process monitoring. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125800

Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. Small Ruminant Research. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002

Kumar, D., Gupta, N., Ghosh, R., Gaonkar, R. H., & Pal, B. C. (2013). α-Glucosidase and α-amylase inhibitory constituent of Carex baccans: Bio-assay guided isolation and quantification by validated RP-HPLC-DAD. Journal of Functional Foods, 5(1), 211–218. https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.007

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. Food Chemistry, 141(2), 975–984. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038

Lee, M., Lee, H., & Kim, J. (2018). Dairy food consumption is associated with a lower risk of the metabolic syndrome and its components: a systematic review and meta-analysis. British Journal of Nutrition, 120(4), 373–384. https://doi.org/10.1017/S0007114518001460

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology, 15(2), 67–78. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004

Li, Y., Kong, B., Liu, Q., Xia, X., & Chen, H. (2017). Improvement of the emulsifying and oxidative stability of myofibrillar protein prepared oil-in-water emulsions by addition of zein hydrolysates. Process Biochemistry. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.010

Li, H., Pan, Y., Yang, Z., Rao, J., & Chen, B. (2019). Improving Antioxidant Activity of β-Lactoglobulin by Nature-Inspired Conjugation with Gentisic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(42), 11741–11751. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05304

Li, J., & Yao, P. (2009). Self-assembly of ibuprofen and bovine serum albumin-dextran conjugates leading to effective loading of the drug. Langmuir, 25(11), 6385–6391. https://doi.org/10.1021/la804288u

Li, Y., Sadiq, F. A., Liu, T. J., Chen, J. C., & He, G. Q. (2015). Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast Kluyveromyces marxianus. Journal of Functional Foods, 16, 278–288. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043

Li, Z., Scott, K., Hemar, Y., & Otter, D. (2018). Protease activity of enzyme extracts from tamarillo fruit and their specific hydrolysis of bovine caseins. Food Research International, 109(March), 380–386. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.039

Lieske, B., & Konrad, G. (1994). A new approach to estimate surface hydrophobicity of proteins. Milchwissenschaft, 49(12), 663–666. http://www0.bwp.hs-anhalt.de/ag/lvm/images/stories/veroeffentlichungen/1994/MW-1994_3.pdf

Liu, C., Bhattarai, M., Mikkonen, K. S., & Heinonen, M. (2019). Effects of Enzymatic Hydrolysis of Fava Bean Protein Isolate by Alcalase on the Physical and Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(23), 6625–6632. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00914

Liu, C., Xia, Y., Hua, M., Li, Z., Zhang, L., Li, S., Gong, R., Liu, S., Wang, Z., & Sun, Y. (2020). Functional properties and antioxidant activity of gelatine and hydrolysate from deer antler base. Food Science and Nutrition. https://doi.org/10.1002/fsn3.1621

Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.013

Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 15(1–2), 73–83. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002

Loveday, S. M. (2019). Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. Annual Review of Food Science and Technology, 10, 311–339. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128

Luo, Y., Pan, K., & Zhong, Q. (2014). Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.048

Ma, J. J., Mao, X. Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S. W., & Li, Y. H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. Lwt, 56(2), 296–302. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.019

McCann, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., & Coventry, M. J. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine αs1-casein. International Dairy Journal, 16(4), 316–323. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.005

McGregor, R. A., & Poppitt, S. D. (2013). Milk protein for improved metabolic health: A review of the evidence. Nutrition and Metabolism, 10(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-46

McMahon, D. J., & Oommen, B. S. (2011). Milk Proteins: Inter-Species Comparison of Milk Proteins: Quantitative Variability and Molecular Diversity. In Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00438-6

Mecherfi, K. E. El, Saidi, D., Kheroua, O., Boudraa, G., Touhami, M., Rouaud, O., Curet, S., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2011). Combined microwave and enzymatic treatments for β-lactoglobulin and bovine whey proteins and their effect on the IgE immunoreactivity. European Food Research and Technology, 233(5), 859–867. https://doi.org/10.1007/s00217-011-1581-y

Megrous, S., Al-Dalali, S., Zhao, X., Chen, C., Cao, Y., Bourouis, I., Mekkaoui, A., Yang, Z., & Yang, Z. (2020). Evaluation of Antidiabetic Activities of Casein Hydrolysates by a Bacillus Metalloendopeptidase. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 26(4), 2519–2527. https://doi.org/10.1007/s10989-020-10045-3

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. Nutrients, 11(5), 1–24. https://doi.org/10.3390/nu11051189

Melville, P. A., Benites, N. R., Ruz-Peres, M., & Yokoya, E. (2011). Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. Journal of Dairy Research, 78(4), 385–390. https://doi.org/10.1017/S0022029911000434

Mendis, S. (2017). Global progress in prevention of cardiovascular disease. Cardiovascular Diagnosis and Therapy, 7(Suppl 1), S32–S38. https://doi.org/10.21037/cdt.2017.03.06

Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. Dairy, 1(3), 233–258. https://doi.org/10.3390/dairy1030016

Mohammadian, M., & Madadlou, A. (2016). Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution. Food Hydrocolloids, 52, 221–230. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.022

Moslehishad, M., Ehsani, M. R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A. N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine

milk by Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637. International Dairy Journal, 29(2), 82–87. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.015

Murphy, K., Curley, D., O'callaghan, T. F., O'shea, C. A., Dempsey, E. M., O'toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A., & Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. Scientific Reports, 7(January), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep40597

Mustățea, G., Ungureanu, E. L., & Iorga, E. (2019). Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food - progress over time: A short review. Journal of Hygienic Engineering and Design, 26, 81–87.

Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. Journal of Food Science, 61(2), 270–275. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14174.x

Nath, A., Eren, B. A., Csighy, A., Pásztorné-Huszár, K., Kiskó, G., Abrankó, L., Tóth, A., Szerdahelyi, E., Kovács, Z., Koris, A., & Vatai, G. (2020). Production of liquid milk protein concentrate with antioxidant capacity, angiotensin converting enzyme inhibitory activity, antibacterial activity, and hypoallergenic property by membrane filtration and enzymatic modification of proteins. Processes. https://doi.org/10.3390/PR8070871

Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Properties and Uses of Protein Hydrolysates (Review). Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 36(5), 533–534.

Ngoh, Y. Y., & Gan, C. Y. (2018). Identification of Pinto bean peptides with inhibitory effects on α-amylase and angiotensin converting enzyme (ACE) activities using an integrated bioinformatics-assisted approach. Food Chemistry, 267, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.166

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2011). Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology | Proteinases. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition, 289–296. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00154-0

O'Loughlin, I. B., Murray, B. A., Brodkorb, A., FitzGerald, R. J., & Kelly, P. M. (2014). Production of whey protein isolate hydrolysate fractions with enriched ACE-inhibitory activity. International Dairy Journal, 38(2), 101–103. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.12.008

OECD/FAO. (2022). Chapter 7. Dairy and dairy products. OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031, 212–223. http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf

Olsen, J. V., Ong, S. E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. Molecular and Cellular Proteomics. https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200

Ong, L., & Shah, N. P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. Lwt, 41(9), 1555–1566. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.026

Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E., & Aliani, M. (2014). *In vitro* antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. Food Chemistry, 150, 366–373. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.107

Pan, D. D., Wu, Z., Liu, J., Cao, X. Y., & Zeng, X. Q. (2013). Immunomodulatory and hypoallergenic properties of milk protein hydrolysates in ICR mice. Journal of Dairy Science, 96(8), 4958–4964. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6758

Pan, D., Guo, Y., & Jiang, X. (2009). Anti-fatigue and antioxidative activities of peptides isolated from milk proteins. Journal of Food Biochemistry, 35(4), 1130–1144. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00440.x

Pasin, G., & Comerford, K. B. (2015). Dairy foods and dairy proteins in the management of type 2 diabetes: A systematic review of the clinical evidence. Advances in Nutrition, 6(3), 245–259. https://doi.org/10.3945/an.114.007690

Pasupuleti, V. K., & Deman, A. L. (2010). Protein hydrolysatesin Biotechnology. In Protein Hydrolysates in Biotechnology. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_8

Patel, G. c. (1994). Structure and foaming properties of peptides isolated from casein hydrolyzates. In The Pennsylvania State University.

Patil, A. T., Meena, G. S., Upadhyay, N., Khetra, Y., Borad, S., & Singh, A. K. (2018). Production and characterization of milk protein concentrates 60 (MPC60) from buffalo milk. Lwt, 91(September 2017), 368–374. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.028

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry. https://doi.org/10.1021/jf60217a041

Peng, X., Kong, B., Xia, X., & Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. International Dairy Journal, 20(5), 360–365. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.019

Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure : a concise review. Journal of Science and Technology, 27(May 2004), 201–212.

Piccolomini, A. F., Iskandar, M. M., Lands, L. C., & Kubow, S. (2012). High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. Food and Nutrition Research, 56, 1–10. https://doi.org/10.3402/fnr.v56i0.17549

Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science and Technology, 11(9–10), 347–356. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6

Power, O., Jakeman, P., & Fitzgerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino Acids, 44(3), 797–820. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9

Rahali, V., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Guéguen, J. (2000). Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β-lactoglobulin: Characterization of the peptides adsorbed at the interface. Nahrung - Food, 44(2), 89–95. https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3803(20000301)44:2<89::aid-food89>3.0.co;2-u

Ramasarma, G. B., Henderson, L. M., & Elvehjem, C. A. (1949). Purified amino acids as a source of nitrogen for the growing rat. The Journal of Nutrition, 38(2), 177–194. https://doi.org/10.1093/jn/38.2.177

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C. R. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9–10), 1231–1237.

Recio, R. T., Guerra, N. P., Torrado, A., & Skibsted, L. H. (2019). Interaction between calcium and casein hydrolysates: Stoichiometry, binding constant, binding sites and thermal stability of casein phosphopeptide complexes. International Dairy Journal. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.009

Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1), 295–302. https://doi.org/10.1021/jf0003911

Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., & Singh, H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review. Frontiers in Nutrition, 7(October), 1–17. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759

Ryan, G., O'Regan, J., & FitzGerald, R. J. (2020). Emulsification properties of bovine milk protein isolate and associated enzymatic hydrolysates. International Dairy Journal, 110, 104811. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104811

Ryan, G., O'Regan, J., & FitzGerald, R. J. (2023). 2331-5156. International Dairy Journal, 137, 105511. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105511

Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. Nutrients, 3(9), 765–791. https://doi.org/10.3390/nu3090765

Sadh, P. K., Chawla, P., & Duhan, J. S. (2018). Fermentation approach on phenolic, antioxidants and functional properties of peanut press cake. Food Bioscience, 22(July 2017), 113–120. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.011

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. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12126

Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2016). Antioxidant peptides isolated from synbiotic yoghurt exhibit antiproliferative activities against HT-29 colon cancer cells. International Dairy Journal, 63, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.003

Sahingil, D., Hayaloglu, A. A., Kirmaci, H. A., Özer, B., & Simsek, O. (2014). Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. Journal of Dairy Research, 81(4), 394–402. https://doi.org/10.1017/S0022029914000326

Saint-Sauveur, D., Gauthier, S. F., Boutin, Y., Montoni, A., & Fliss, I. (2009). Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and Escherichia coli infected mice. International Dairy Journal, 19(9), 537–544. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.010

Salami, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Ehsani, M. R., Yousefi, R., Haertlé, T., Chobert, J. M., Razavi, S. H., Henrich, R., Balalaie, S., Ebadi, S. A., Pourtakdoost, S., & Niasari-Naslaji, A. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6), 3297–3302. https://doi.org/10.1021/jf9033283

Samfira, I., Rodino, S., Petrache, P., Cristina, R. T., Butu, M., & Butnariu, M. (2015). Characterization and identity confirmation of essential oils by mid infrared absorption spectrophotometry. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 10(2), 557–566.

Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., & Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (Clupea harengus) byproduct hydrolysates. Journal of Food Science, 68(7), 2196–2200. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05746.x

Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I. I., & Reppond, K. D. (2004). Properties of protein powders from arrowtooth flounder (Atheresthes stomias) and herring (Clupea harengus) byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(16), 5040–5046. https://doi.org/10.1021/jf0351422

Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkui, W., & Bechtel, P. J. (2005). Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (Oncorhynchus nerka) Enzymatic Hydrolysates. Food Chemistry and Toxicology, 70(6), 401–406. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11437.x

Schaafsma, G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. In European Journal of Clinical Nutrition. https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.56

Scherze, I., & Muschiolik, G. (2001). Effects of various whey protein hydrolysates on the emulsifying and surface properties of hydrolysed lecithin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 21(1–3), 107–117. https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00189-8

Schüle, S., Frieß, W., Bechtold-Peters, K., & Garidel, P. (2007). Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.08.014

Shazly, A. B., Mu, H., Liu, Z., El-Aziz, M. A., Zeng, M., Qin, F., Zhang, S., He, Z., & Chen, J. (2019). Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. Food Chemistry, 274(March 2017), 261–267. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.137

Shilpashree, B. G., Arora, S., Chawla, P., Vakkalagadda, R., & Sharma, A. (2015). Succinylation of sodium caseinate and its effect on physicochemical and functional properties of protein. Lwt, 64(2), 1270–1277. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.008

Shobharani, P., & Agrawal, R. (2009). Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60(SUPPL. 6), 70–83. https://doi.org/10.1080/09637480802668463

Singh, A. M., & Dalgleish, D. G. (1998). The Emulsifying Properties of Hydrolyzates of Whey Proteins. Journal of Dairy Science, 81(4), 918–924. https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75651-6

Singh, A. M., & Dalgleish, D. G. (1998). The Emulsifying Properties of Hydrolyzates of Whey Proteins. Journal of Dairy Science, 81(4), 918–924. https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75651-6

Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11(2–3), 154–163. https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2005.11.002

Singh, H. (2011). Milk Protein Products: Functional Properties of Milk Proteins. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition, 887–893. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00352-6

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021

Sinthuvanich, C., Veiga, A. S., Gupta, K., Gaspar, D., Blumenthal, R., & Schneider, J. P. (2012). Anticancer β-hairpin peptides: Membrane-induced folding triggers activityc. Journal of the American Chemical Society, 134(14), 6210–6217. https://doi.org/10.1021/ja210569f

Song, J. J., Wang, Q., Du, M., Ji, X. M., & Mao, X. Y. (2017). Identification of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from mare whey protein hydrolysates. Journal of Dairy Science. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11828

Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. Industrial Crops and Products, 43(1), 538–544. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.005

Spellman, D., Kenny, P., O'Cuinn, G., & Fitzgerald, R. J. (2005). Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with Bacillus licheniformis proteinase activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(4), 1258–1265. https://doi.org/10.1021/jf048754a

Su, R., Liang, M., Qi, W., Liu, R., Yuan, S., & He, Z. (2012). Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. Food Chemistry, 133(3), 851–858. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.103

Susi, H., & Byler, M. (1988). Fourier Deconvolution of the Amide I Raman Band of Proteins As Related To Conformation. Applied Spectroscopy, 42(5), 819–826. https://doi.org/10.1366/0003702884428905

Svenning, C., Brynhildsvold, J., Molland, T., Langsrud, T., & Elisabeth Vegarud, G. (2000). Antigenic response of whey proteins and genetic variants of β-lactoglobulin - The effect of proteolysis and processing. International Dairy Journal, 10(10), 699–711. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00101-1

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011

TEPGE, Süt ve Süt Ürünleri Durum ve Tahmin 2021, Yayın No: 331, 2021, Ankara.

Tidona, F., Criscione, A., Guastella, A. M., Zuccaro, A., Bordonaro, S., & Marletta, D. (2009). I peptidi bioattivi nei prodotti lattiero-caseari. Italian Journal of Animal Science, 8(3), 315–340. https://doi.org/10.4081/ijas.2009.315

Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 241, 118636. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636

Toedebusch, R. G., Childs, T. E., Hamilton, S. R., Crowley, J. R., Booth, F. W., & Roberts, M. D. (2012). Postprandial leucine and insulin responses and toxicological

effects of a novel whey protein hydrolysate-based supplement in rats. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 9. https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-24

Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. Food Chemistry. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119

Tong, X., Li, W., Xu, J. Y., Han, S., & Qin, L. Q. (2014). Effects of whey protein and leucine supplementation on insulin resistance in non-obese insulin-resistant model rats. Nutrition, 30(9), 1076–1080. https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.01.013

Udenigwe, C. C., Abioye, R. O., Okagu, I. U., & Obeme-Nmom, J. I. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. Current Opinion in Food Science, 39, 182–189. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.005

Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D. B. A., & Voragen, A. G. J. (2001). Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. https://doi.org/10.1021/jf010144c

Van der Ven, Cornelly, Muresan, S., Gruppen, H., De Bont, D. B. A., Merck, K. B., & Voragen, A. G. J. (2002). FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. https://doi.org/10.1021/jf020387k

Vargas-Bello-Pérez, E., Márquez-Hernández, R. I., & Hernández-Castellano, L. E. (2019). Bioactive peptides from milk: Animal determinants and their implications in human health. Journal of Dairy Research, 86(2), 136–144. https://doi.org/10.1017/S0022029919000384

Vásquez-Villanueva, R., Marina, M. L., & García, M. C. (2016). Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues. Journal of Chromatography A, 1428, 185–192. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.032

Wang, J., Su, Y., Jia, F., & Jin, H. (2013). Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. Chemistry Central Journal. https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-62

Wang, Y., Wang, S., Li, R., Wang, Y., Xiang, Q., Li, K., & Bai, Y. (2022). Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate. Food Hydrocolloids, 124(July 2021). https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107351

Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., & Zhou, L. (2014). Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. Journal of Chemistry, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/475389

Worldometers. (2023). https://www.worldometers.info/world-population/

Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Research International, 36(9–10), 949–957. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2

Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., Liu, L., & Wang, Z. (2018). Reducing the allergenic capacity of β-lactoglobulin by covalent conjugation with dietary

polyphenols. Food Chemistry, 256(February), 427–434. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158

Wusigale, Liang, L., & Luo, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. Trends in Food Science & Technology, 97, 391–403. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.01.027

Yalçın, A. S. (2006). Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. Current Pharmaceutical Design, 12, 1637–1643.

Yan, S., Xu, J., Zhang, S., & Li, Y. (2021). Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate. Lwt, 142(January), 110881. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110881

Yao, J., Lin, C., Tao, T., & Lin, F. (2013). The effect of various concentrations of papain on the properties and hydrolytic rates of β-casein layers. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 101, 272–279. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.030

Young, L., Jernigan, R. L., & Covell, D. G. (1994). A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. Protein Science, 3(5), 717–729. https://doi.org/10.1002/pro.5560030501

Yu, P. (2005). Protein secondary structures (α-helix and β-sheet) at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviours of protein: a new approach. British Journal of Nutrition, 94(5), 655–665. https://doi.org/10.1079/bjn20051532

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., & Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. Food Chemistry, 129(4), 1376–1382. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.067

Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M., & Yu, G. (2019). Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. Journal of Cereal Science, 85(May 2018), 168–174. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.001

Zenker, H. E., Raupbach, J., Boeren, S., Wichers, H. J., & Hettinga, K. A. (2020). The effect of low vs. high temperature dry heating on solubility and digestibility of cow's milk protein. Food Hydrocolloids, 109(June), 106098. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106098

Zhang, Q. X., Ling, Y. F., Sun, Z., Zhang, L., Yu, H. X., Kamau, S. M., & Lu, R. R. (2012). Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. Biotechnology Letters, 34(11), 2001–2006. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1017-1

Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X. D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W., & Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food Chemistry, 134(3), 1360–1367. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.033

Zhao, R., Kaakati, R., Lee, A. K., Liu, X., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond. Cancer and Metastasis Reviews, 37(2–3), 227–236. https://doi.org/10.1007/s10555-018-9736-y

Zhao, X., Bai, Y., Xing, T., Xu, X. lian, & Zhou, G. (2018). Use of an isoelectric solubilization/precipitation process to modify the functional properties of PSE (pale, soft,

exudative)-like chicken meat protein: A mechanistic approach. *Food Chemistry*, *248*(December 2017), 201–209. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.048

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Bekiroğlu H., Bozkurt F., Sağdıç O. (2021). Investigation of the effect of enzymatic hydrolysis on cytotoxic and antioxidant characters of casein. BIO TürkiyeUluslararası Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).

Makaleler

1. Bekiroglu, H., Bozkurt, F., Karadag, A., Ahhmed, A. M., & Sagdic, O. (2022). "The effects of different protease treatments on the techno-functional, structural, and bioactive properties of bovine casein," Preparative Biochemistry & Biotechnology, *52*(10), 1097-1108, https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033988.