T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEOLİTİK AKTİVİTESİ YÜKSEK YOĞURT BAKTERİLERİ İLE PROBİYOTİK KÜLTÜR KOMBİNASYONLARINDAN BİYOAKTİF PEPTİD ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman

Doç. Dr. Mustafa TÜRKER

Ağustos, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEOLİTİK AKTİVİTESİ YÜKSEK YOĞURT BAKTERİLERİ İLE PROBİYOTİK KÜLTÜR KOMBİNASYONLARINDAN BİYOAKTİF PEPTİD ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 2.08.2024 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. Mustafa TÜRKER Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ, Üye
Namık Kemal Üniversitesi _____

Doç. Dr. Hale İnci ÖZTÜRK, Üye
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Bozkurt, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Proteolitik Aktivitesi Yüksek Yoğurt Bakterileri ile Probiyotik Kültür Kombinasyonlarından Biyoaktif Peptid Üretimi 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.

Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana her aşamada verdiği destek, rehberlik, bilgi birikimi ve göstermiş olduğu sabır için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince sağladığı katkılardan dolayı eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRKER'e, geri bildirimleri ve deneyimleriyle beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi ve Tez Savunma Jürisi üyeleri Sayın Prof. Dr. Muhammet ARICI, Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ, Doç. Dr. Hale İnci ÖZTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Fatih BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım. Bu süreç boyunca bana her zaman destek olan Prof. Dr. Enes DERTLİ ve Doç. Dr. Salih KARASU'ya verdikleri güven, cesaret ve akademik destek için teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sürecinde bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Hatice BEKİROĞLU ve Arş. Gör. Sevda DERE'ye teşekkür ederim. Bu süreç boyunca bana verdikleri sevgi, sabır, destek ve gösterdikleri anlayış için canım anneme, babama ve değerli eşime sonsuz teşekkürler.

Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ **vi**
KISALTMA LİSTESİ **vii**
ŞEKİL LİSTESİ **ix**
TABLO LİSTESİ **x**
ÖZET **xi**
ABSTRACT **xiii**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER **5**
2.1 Biyoaktif Peptidler (BP) 5
2.1.1 Biyoaktif Peptid Kaynakları 5
2.1.2 Biyoaktif Peptidlerin Üretimi 6
2.1.3 Biyoaktif Peptidlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri 15
2.1.4 Biyoaktif Peptidlerin Fraksiyonlanması ve İdentifikasyonu 25
2.2 Biyoinformatik Yöntemler 28
3 MATERYAL VE METOT **29**
3.1 Kullanılan Materyaller, Mikroorganizmalar ve Kimyasallar 29
3.2 Kullanılacak Suşların Seçimi 29
3.2.1 Orto-fitaldialdehit (OPA) Metodu 29
3.2.2 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Analizi 30
3.3 Biyoreaktörde Fermentasyon 30
3.3.1 Fermentasyon Koşulları 30
3.3.2 Proteolizin Belirlenmesi 31
3.3.3 Mikroorganizma Sayımı 31
3.4 Peptidlerin Hazırlanması 32
3.4.1 Peptidlerin Eldesi 32
3.4.2 Peptidlerin Fraksiyonlanması 32

3.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Analizi 33
3.5 Peptidlerin Analizleri 33
3.5.1 Protein Miktarının Belirlenmesi 33
3.5.2 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 34
3.5.3 Antidiyabetik Aktivitenin Belirlenmesi 35
3.5.4 ACE-inhibitör Aktivitenin Belirlenmesi 36
3.5.5 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi 36
3.5.6 Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi 37
3.6 İstatistiksel Analizler 37
4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA **38**
4.1 Suşların Seçimi 38
4.2 Fermentasyon, Mikroorganizma Sayım Sonuçları ve Proteoliz 39
4.3 Peptidlerin Kurutulması, Fraksiyonlanması ve SDS-Page Analizi 41
4.4 Örneklerin Protein Miktarı 43
4.5 Antioksidan Aktivite 44
4.6 Antidiyabetik Aktivite 47
4.7 ACE-inhibitör Aktivite 50
4.8 Antibakteriyel Aktivite 51
4.9 Sitotoksik Aktivite 54
5 SONUÇ **57**
KAYNAKÇA **59**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **75**

SİMGE LİSTESİ

w	Ağırlık
α	Alfa
β	Beta
g	Gram
GHz	Gigahertz
dk	Dakika
v	Hacim
κ	Kappa
MHz	Megahertz
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molarite
nm	Nanometre
L	Litre
sa	Saat
s	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
U	Unit
V	Volt
%	Yüzde
IC50	%50 inhibitör konsantrasyonu

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
AMP	Antimikrobiyal peptidler
BP	Biyoaktif peptid
B.	*Bifidobacterium*
Caco-2	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
CCK	Kolesistokinin
CEP	Hücre duvarı ilişkili proteinazlar
CPP	Kazeinofosfat
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeyici antioksidan güç
Da	Dalton
DEA	Darbeli elektrik alan
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle's ortamı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitrosalisilik asit
DPP-IV	Dipeptidil peptidaz IV
HCl	Hidroklorik asit
kDa	Kilodalton
kob	Koloni oluşturma birimi
L.	*Lacticaseibacillus*
LAB	Laktik asit bakterisi
Lc.	*Lactococcus*
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MF	Mikrofiltrasyon
MRS	de Man Rogosa Sharpe
MRS-V	de Man Rogosa Sharpe-vankomisin
MS	Kütle spektrometrisi
MW	Molekül ağırlığı
MWCO	Molekül ağırlığı ayırma sınırı
NaOH	Sodyum hidroksit
NF	Nanofiltrasyon
OD	Optik dansite
OPA	O-fitaldialdialdehit

PES	Polieter sülfon
P-NPG	Para-nitrofenil-a-D-glukopiranozid
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SÇE	Suda çözünür ekstrakt
SDS	Dodesil Sülfat Sodyum Tuzu
ssp	Alt türler
RO	Ters osmoz
TE	Troloks eşdeğeri
TCA	Trikloroasetik asit
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin
UDE	Ultrases destekli ekstraksiyon
UF	Ultrafiltrasyon
YHB	Yüksek hidrostatik basınç
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5 karboksanilid

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Biyoaktif peptid üretimi (Chauhan & Kanwar, 2020)..... 7

Şekil 2.2 Enzimatik hidrolizle biyoaktif peptidlerin serbest kalması (Cruz-Casas vd., 2021)..... 8

Şekil 2.3 Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi (Higgins, 1998)..... 10

Şekil 2.4 Süt kaynaklı biyoaktif peptidlerin fizyolojik özellikleri (Korhonen & Pihlanto, 2006)..... 15

Şekil 2.5 Basınçla çalışan membran prosesinin şematik gösterimi (Alavi & Ciftci, 2023) 26

Şekil 3.1 Peptidlerin fraksiyonlanması..... 33

Şekil 4.1 *L. delbrueckii* subps. *bulgaricus* ile *S. thermophilus* suşlarının SDS-page bantları (* ile işaretli olan suşlar *S. thermophilus* suşlarıdır.)..... 39

Şekil 4.2 Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon..... 39

Şekil 4.3 Örneklerin proteolizi 40

Şekil 4.4 Liyofilize örnek 42

Şekil 4.5 Örneklerin SDS görüntüleri..... 43

Şekil 4.6 Örneklerin antioksidan aktivitesi, A) ABTS, IC50 değeri (mg protein/mL), B) FRAP, mg TE/g protein 46

Şekil 4.7 Örneklerin ACE-inhibitör aktivitesi..... 51

Şekil 4.8 Örneklerin ≤5 kDa fraksiyonlarının Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi (%) 55

Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonda B4 numunesi ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri..... 56

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Fermente süt ürünlerinin biyoaktiviteleri (Hafeez vd., 2014) 23
Tablo 2.2 Fermente süt ürünlerinin biyoaktiviteleri (Hafeez vd., 2014) (devamı) 24
Tablo 2.3 BP'lerin özelliklerinin belirlenmesinde basınç tahrikli membran teknolojisi 27
Tablo 3.1 OPA çözeltisi için kullanılan bileşenler..... 29
Tablo 3.1 OPA çözeltisi için kullanılan bileşenler (devamı) 30
Tablo 3.2 Biyoreaktörde kullanılan mikroorganizma kombinasyonları 31
Tablo 4.1 Suşların proteolitik aktiviteleri 38
Tablo 4.2 pH 4,6'da örneklerin mikroorganizma sayıları ve fermentasyon süreleri..... 41
Tablo 4.3 Örneklerin protein miktarları 44
Tablo 4.4 Örneklerin α-glukosidaz inhibisyon aktivitesi (IC50 mg protein/mL) 48
Tablo 4.5 Örneklerin α-amilaz inhibisyon aktivitesi (IC50 mg protein/mL)..... 49
Tablo 4.6 Örneklerin antibakteriyel aktivitesi (% inhibisyon)..... 53
Tablo 4.7 Örneklerin antibakteriyel aktivitesi (% inhibisyon) (devamı) 54

ÖZET

Proteolitik Aktivitesi Yüksek Yoğurt Bakterileri ile Probiyotik Kültür Kombinasyonlarından Biyoaktif Peptid Üretimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı
Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş-Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRKER

Bu çalışmada yoğurt starterleri ve probiyotiklerle süt fermentasyonu sonucu üretilen biyoaktif peptidlerin farklı fraksiyonlarının antioksidan, antidiyabetik, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör, antibakteriyel ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Süt, yoğurt starterlerinin yanı sıra *Lacticaseibacillus (L.) rhamnosus* GG ve *Lacticaseibacillus paracasei* ile birlikte ve ayrı ayrı fermente edildikten sonra 5 ve 10 kDa (kilodalton) filtrelerden geçirilmiştir. Örnekler arasında fermentasyon süresi açısından önemli bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Biyoaktif peptidlerin antioksidan, antidiyabetik, ACE-inhibitör, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri probiyotik suşlarından ve peptidin moleküler ağırlığından önemli ölçüde etkilenirken ($p<0,05$). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus* + *L. rhamnosus* GG + *L. paracasei*'nin uygulandığı ≤5 kDa peptidlerin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Yoğurt starterleri ile *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* kullanılması, α-amilaz aktivitesini, α-glukosidaz aktivitesini ve ACE inhibitör aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Tüm numuneler *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* Typhimurium'a karşı

antibakteriyel aktivite gösterirken, peptidlerin moleküler ağırlığına göre antibakteriyel aktivitede önemli düzeyde farklılık görülmüştür ($p<0,05$). Sitotoksik aktivite, biyoaktif peptidlerin Caco-2 adenokarsinom hücresine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve probiyotiklerin varlığının etkiyi artırdığını göstermiştir. Çalışmanın sonuçları, *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei*'nin yoğurt starterleri ile birlikte kullanılmasının, süt ürünlerinde oluşan peptidlerin biyoaktif özelliklerini iyileştirebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yoğurt starterleri, *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei*, fermentasyon, biyoaktif peptidler, ultrafiltrasyon.

ABSTRACT

Production of Bioactive Peptides from Combinations of Probiotic Culture and Yogurt Bacteria with High Proteolytic Activity and Determination of Their Functional Properties

Selma KAYACAN CAKMAKOGLU

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Osman SAGDIC

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TURKER

This study aimed to evaluate the antioxidant, antidiabetic, angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory, antibacterial and cytotoxic effects of different fractions of bioactive peptides produced as a result of milk fermentation with yogurt starters and probiotics. In addition to yogurt starters, milk was fermented separately and together with *Lacticaseibacillus (L.) rhamnosus* GG and *L. paracasei*, then passed through 5 and 10 kDa (kilodalton) filters. A significant difference was observed in the fermentation time between the samples. The antioxidant, antidiabetic, ACE-inhibitory, antibacterial and cytotoxic activities of the bioactive peptides were significantly affected by the probiotic strains and the molecular weight of the peptide ($p<0.05$). ≤5 kDa fractions of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus* + *L. rhamnosus* GG + *L. paracasei* had the highest antioxidant activity. The addition of *L. rhamnosus* GG and *L. paracasei* to yogurt starters significantly increased α-amylase activity, α-glucosidase activity and ACE inhibitor activity. All samples showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* Typhimurium and significant differences were observed in antibacterial activity according to the molecular weight of the peptides ($p<0.05$). Cytotoxic activity showed that bioactive peptides

had cytotoxic effect against Caco-2 adenocarcinoma cell, and the presence of probiotics increased the effect. The results of the study suggest that the use of *L. rhamnosus* GG and *L. paracasei* together with yogurt starters, could improve the bioactive properties of peptides formed in dairy products.

Keywords: Yogurt starters, *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei*, fermentation, bioactive peptides, ultrafiltration.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Diyet ve sağlık arasındaki ilişkiye dair artan algılarından dolayı, tüketiciler normal diyetlerinde bulundukları zaman sağlık açısından pozitif etki gösterebilecek fonksiyonel gıdaların kullanımı yoluyla hastalıkların önlenmesi ve sağlıklarının iyileştirilmesi ile ilgilenmektedir (Hafeez vd., 2014). Son yıllarda, özellikle fenolik bileşikler, biyoaktif peptidler, vb. gibi çeşitli besin kaynaklarına sahip yeni fonksiyonel bileşenler üzerine yapılan çalışmaların sayısı önemli ölçüde artmıştır (Karami & Akbari-adergani, 2019). Biyoaktif peptidler, vücut fonksiyonları üzerinde yararlı bir etkisi olan ve / veya insan sağlığını olumlu yönde etkileyen, bir protein içindeki peptid dizileri olarak tanımlanır (Chakrabarti vd., 2018). Süt, insan beslenmesinde önemli bir protein kaynağıdır ve yaklaşık 32 g protein/L sağlar (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Sütteki toplam proteinin yaklaşık %80'ini kazein oluştururken, geri kalan %20'sini serum proteinleri oluşturur (Hu vd., 2024).

Potansiyel biyoaktif peptidler çeşitli hayvansal ve bitkisel proteinlerden tanımlansa da, süt proteinleri biyoaktif peptidlerin temel kaynağıdır ve bu peptidler farklı biyolojik aktivitelere sahiptir (Hafeez vd., 2014). Süt proteinleri biyolojik olarak aktif birçok farklı peptidin öncüleridir. Bu peptidler protein dizisi içerisinde aktif değildir, ancak sindirim veya yiyeceklerin işlenmesi sırasında enzimatik proteolizle serbest kalabilir (Gobbetti vd., 2000).

Süt kaynaklı peptidlerin insanlarda antihipertansif aktivite (α_{s1}-kazein, β-kazein, α-laktalbumin, β-laktoglobulin kaynaklı), kolesterol düşürücü aktivite (β-laktoglobulin ve laktostatin kaynaklı), antioksidan aktivite (α-laktalbumin kaynaklı), antitrombotik aktivite (κ-kazein ve α-laktalbumin kaynaklı), immumomodulatör aktivite (α-β-κ-kazein, serum proteini ve laktoferrin kaynaklı) gösterdiği bilinmektedir (Marcone vd., 2017). Bu etkilerin ortaya çıkabilmesi için peptidlerin serbest kalması gerekir (Korhonen, 2009).

Yoğurt mevcut birçok besin ihtiyacını karşılaşması nedeniyle oldukça popülerdir. Yoğurdun işlevselliği, laktik fermantasyon sırasında biyoaktif peptidlerin

salınmasıyla daha da arttırılır (Shah, 2007). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* geleneksel yoğurt üretiminde kullanılan starter kültürlerdir (Meybodi vd., 2020). Ancak çoklu LAB suşları ile fermente edilmiş yoğurtlar, yoğurdun besinsel faydasını ve biyofonksiyonunu geliştirmek için yaygın olarak üretilmektedir ve LAB'nin yararları ve teknolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde tartışılmaktadır (Vasiljevic & Shah, 2008). LAB'lerin proteolitik sistemi sayesinde süt proteinleri, fermente ürünlerde peptidlere ve amino asitlere kadar parçalanır. Süt ürünü türü, kullanılan teknoloji ve özellikle bakteri türü proteolitik aktiviteyi etkiler. Sağlık üzerinde faydalı etkileri olan peptidler üretmek için farklı mayalar ve LAB'lerin bir kombinasyonu kullanılabilir (Moreno-Montoro vd., 2018). Bu nedenle sinerjistik etkisiyle fermente ürünlerin biyoaktif özelliklerinin arttırılmasına yönelik son çalışmalarda farklı probiyotiklerin fermente ürünlerde kombine kullanımı artmıştır. LAB'lerde bulunan CEP (hücre duvarı ilişkili proteinazlar)'lerin substrat spesifikliği ve içeriği farklıdır ve LAB'lerin hücre içi peptidazları da farklı olabilir. Bu nedenle proteolitik aktivite, proteolitik model ve biyoaktif peptidlerin salınma potansiyeli LAB'ler arasında farklılık gösterir (Gu vd., 2020). Yapılan çalışmalar fermentasyonda farklı kültürlerin birlikte kullanımının süt peptidlerin özelliklerini artırdığını göstermiştir. Probiyotik ilavesi ile üretilen yoğurtların yüksek ACE (anjiyotensin dönüştürücü enzim) inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Donkor vd., 2007). Başka bir çalışmada en yüksek antioksidan, antimutajenik ve antibakteriyel aktivitenin *S. thermophilus, L. bulgaricus* ve *Bifidobacterium (B.) lactis* ile üretilen yoğurda ait olduğu tespit edilmiştir (Heydari vd., 2023). Yapılan bir başka çalışmada 8 farklı yogurt üretilmiştir. Tüm yoğurtlar *S. thermophilus* ile *L. bulgaricus* starterlerine ek olarak farklı probiyotikler kullanılarak üretilmişlerdir. En yüksek antioksidan ve antimutajenik aktivitenin *S. thermophilus, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei* ve *L. paracasei* ile üretilen yoğurda ait olduğu belirtilmiştir (Sah vd., 2014).

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, sütün biyoreaktörde farklı suşlar ile fermente edilmesi ve üretilen biyoaktif peptidlerin ekstraksiyonu amaçlanmıştır. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarına ek olarak *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* ile ayrı ayrı ve birlikte fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sonucunda üretilen

peptidlerin ekstrakte edilmesi ve elde edilen peptidlerin molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlanması amacıyla 10 kDa ve 5 kDa boyutlarındaki filtreler kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı moleküler boyutlarda fraksiyonlanan peptidlerin antioksidan, antidiyabetik, ACE inhibitör, antibakteriyel ve sitotoksik aktivite gibi biyoaktif özelliklerin belirlenmesi ve *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* suşlarının kullanımının bu özellikler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu analizler neticesinde, farklı moleküler boyuttaki peptid fraksiyonlarının ve farklı kültür kombinasyonlarının biyolojik aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Kardiyovasküler hastalıklar, tansiyon, diyabet, kanser vb. hastalıkların küresel bir yaygınlığı vardır ve bu hastalıkların doğrudan tedavisi her zaman ilaç toksisitesine yol açabilen farmasötik bir yaklaşımla olmuştur. Ayrıca, herhangi bir ilacın uzun süreli kullanımının, sağlığın bozulması ve dolayısıyla sağlık bakım maliyetlerinin artmasına neden olabilecek olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle, çağın değişimi, sağlıklı yaşam tarzı seçimleri yoluyla hastalıkların önlenmesi ve bireylerin erken tedavilerine önem verilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla, biyoaktif peptidleri içeren doğal gıda kaynakları hastalıkların önlenmesine önemli ölçüde yardımcı olabilir ve ayrıca ilaç tedavisine bağımlılığı azaltarak küresel olarak sağlık bakım maliyetlerini düşürebilir (Girgih vd., 2014)**.** Bu nedenle son yıllarda gıdalardan elde edilen biyoaktif peptidler, gıda ve sağlık sektörlerinde büyük ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalar yeni biyoaktif peptidler üretme, varolan biyoaktif peptidlerin miktarını arttırma, üretilen biyoaktif peptidlerin peptid profillerini ayrıntılı olarak inceleme yönünde olmaktadır.

Mikrobiyal fermentasyon biyoaktif peptidlerin açığa çıkmasını sağlayan yöntemlerden biridir. Yoğurt üretiminde kullanılan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşları süt proteinlerini parçalayarak biyoaktif peptidlerin açığa çıkmasını sağlarlar. Farklı LAB suşları sahip oldukları farklı proteolitik özellikleri sayesinde proteinleri parçalarak değişik özelliklerde biyoaktif peptid üretimi sağlayabilirler. Bu kapsamda *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları ile probiyotik *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* suşlarının farklı proteolitik aktivitelere sahip olmasına bağlı olarak sütte farklı biyoaktif peptidleri meydana getirmesi, bu

peptidlerin antioksidan, antidiyabetik, ACE inhibitör, antibakteriyel ve sitotoksik aktivite gibi fonksiyonel aktivitelerin etkilenmesi ve farklı boyuttaki peptid fraksiyonlarının bu biyolojik aktiviteler üzerinde etkisinin araştırılması bu tezin hipotezini oluşturmuştur.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Biyoaktif Peptidler (BP)

Biyoaktif peptid terimine ilk defa 1950 yılında Mellander'in kazein türevli fosforile peptidlerin raşitik bebeklerde D vitamininden bağımsız kemik kalsifikasyonunu artırdığını öne sürdüğü kazeinofosfopeptidler (CPP'ler) olarak değinilmiştir ve biyoaktif peptidlerin günümüzde bilimsel ve ticari olarak ilgi görmeye başlamasıyla birlikte bu konu hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır (Martínez-Medina vd., 2019). Biyoaktif peptidler genellikle 2 ila 20 arasında amino asit dizilerinden oluşurlar (Chakrabarti vd., 2018). BP, amid veya peptid bağları olarak da bilinen kovalent bağlarla birleştirilen amino asitlerin oluşturduğu organik maddelerdir (Sánchez & Vázquez, 2017). Biyoaktiviteleri peptidi oluşturan amino asit dizisindeki amino asit komposizyonu ve konumuna bağlıdır (Mora vd., 2016). BP ve proteinler, canlı organizmaların metabolik fonksiyonlarında ve dolayısıyla insan sağlığında önemli roller oynamaktadır. Hormon veya ilaç benzeri aktiviteler gösterirler ve etki şekillerine göre antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, opioid, immünomodülatör, mineral bağlayıcı ve antioksidatif olarak sınıflandırılabilirler (Sánchez & Vázquez, 2017). Bu etkiler protein içinde şifrelenen peptidlerin gıda işleme sırasında enzimatik olarak veya mikrobiyal fermentasyon yoluyla serbest bırakılması ile ortaya çıkarlar (Chakrabarti vd., 2018). BP, gıdalardaki oksidasyonu ve mikrobiyal bozulmayı önleyebilen yeni nesil biyolojik olarak aktif düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir. Çeşitli tıbbi durumların tedavisinde kullanılabilirler, böylece yaşam kalitesini arttırılar. Son zamanlarda fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler, özellikle insan sağlığı üzerindeki etkileri ve bazı hastalıkların önlenmesinde kullanımları nedeniyle büyük ilgi uyandırmışlardır (Sánchez & Vázquez, 2017).

2.1.1 Biyoaktif Peptid Kaynakları

Biyoaktif peptidler pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Süt (Cui vd., 2022), peynir (Corrêa vd., 2014), yoğurt (Şanlıdere Aloğlu & Öner, 2011), diğer çeşitli süt ürünleri (Choi vd., 2012) gıdalardan elde edilen biyoaktif peptidlerin en büyük kaynaklarıdır (Sánchez & Vázquez, 2017). Bunlar dışında et, balık (Ryan vd.,

2011), yumurta (Y.-F. Liu vd., 2018) gibi hayvansal pek çok gıdadan elde edilmiştir. Son zamanlardaki çalışmalar biyoaktif peptidlerin, dünya protein ihtiyacının yarısını sağlayan tahıllar başta olmak üzere bitki kaynaklarından ve aynı zamanda tam bir amino asit dizisine sahip zengin bir protein kaynağı olan baklagillerden elde edilmesi üzerine de odaklanmıştır (Mahgoub vd., 2023). Buğday, mısır, pirinç (Gong vd., 2022), soya (Singh & Vij, 2017), fasulye (Ngoh & Gan, 2016), fındık (C. Liu vd., 2018), nohut (Yust vd., 2003), badem (Mirzapour vd., 2017), vişne (Guo vd., 2015), zeytin (Vásquez-Villanueva vd., 2018) gibi bitkisel kaynaklardan da biyoktif peptidler elde edilmektedir. Farklı gıda endüstrilerinin birçok atık ürünü de potansiyel BP kaynakları olarak görülmektedir (Chauhan & Kanwar, 2020).

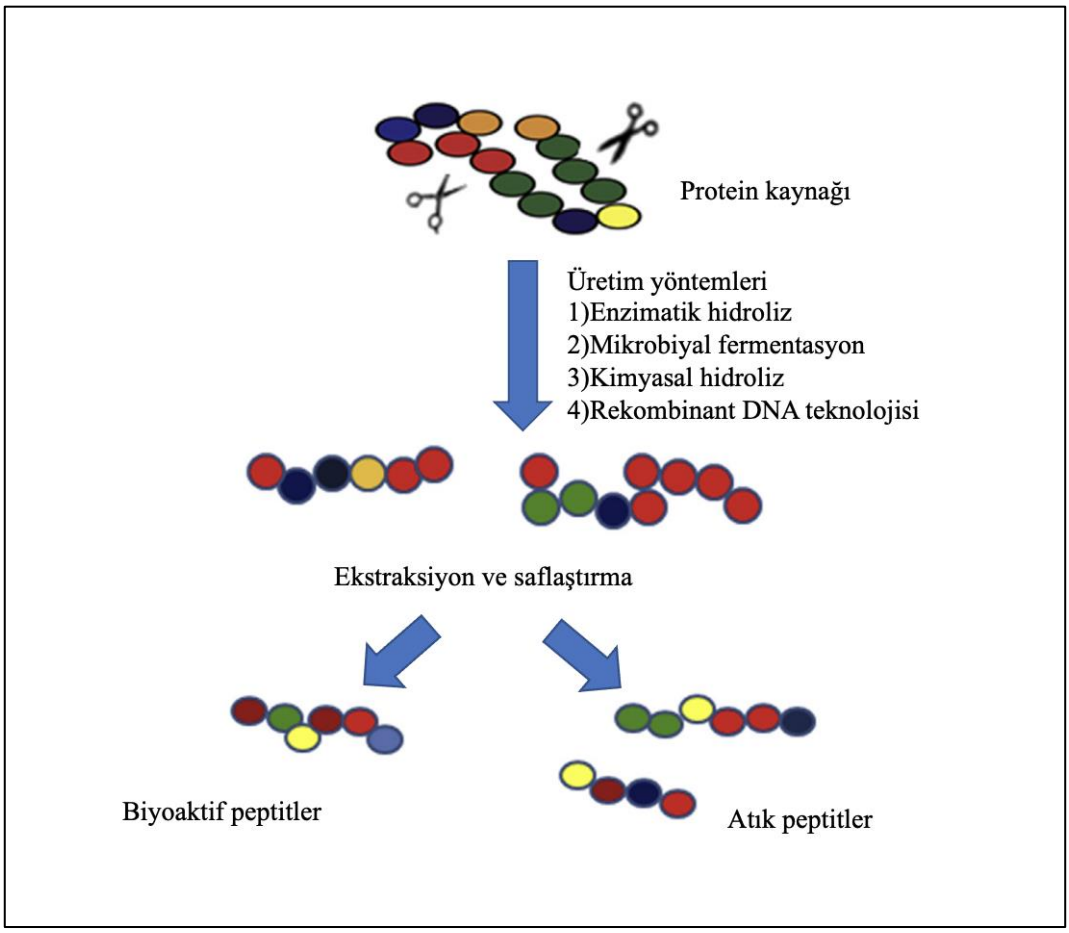
2.1.1.1 Süt Proteinleri

Keçi, manda, koyun, deve, kısrak ve yak gibi farklı hayvanların sütünün zengin bir BP kaynağı olduğu rapor edilmiştir. Bunların arasında ağırlıklı olarak inek sütü proteinlerinden izole edilen ve karakterize edilen peptidler bulunmaktadır (El-Salam & El-Shibiny, 2013). Süt proteinleri, besinsel önemleri ve gıda endüstrisindeki genel uygulamaları nedeniyle çeşitli biyoaktiviteler açısından sıklıkla değerlendirilmektedir. İnek sütünde bulunan proteinlerin yaklaşık %80'ini kazeinler oluşturur ve geri kalan kısım ise serum proteinleri olarak adlandırılır. Kazeinler fosfoproteinlerdir ve α_{s1}-, α_{s2}-, β- ve κ-kazeinleri içerir. Serum proteinleri, β-laktoglobulin, α-laktalbümin, sığır serum albümini ve immünoglobulinlerden oluşan proteinlerdir (Sah vd., 2018). Süt proteinleri ve bunların fraksiyonları, sağlığı teşvik eden fonksiyonel gıdalar için potansiyel bileşenler olarak kabul edilen biyoaktif peptidlerin ana kaynaklarıdır (Giacometti & Buretić-Tomljanović, 2017).

2.1.2 Biyoaktif Peptidlerin Üretimi

BP'lerin fizyolojik, kimyasal, fiziksel, farmakolojik, biyokimyasal ve klinik çalışmalarda uygulanmasına yönelik yüksek talep, bunların endüstriyel üretiminin yolunu açmıştır. Ancak uygun teknoloji eksikliği ve düşük verim, endüstriyel üretimin önünde büyük bir engeldir (Chauhan & Kanwar, 2020). Biyoaktif peptidler geleneksel olarak enzimatik hidroliz, mikrobiyal fermentasyon veya kimyasal hidroliz yoluyla üretilirler (Ulug vd., 2021). Biyoaktif peptidlerin

üretiminde kullanılan bir diğer yaklaşım da DNA rekombinant teknolojisidir (Chauhan & Kanwar, 2020). Ayrıca biyoaktif peptid üretimi için yeni ve gelişmekte olan gıda işleme teknolojilerinden de yararlanılmaktadır (Marciniak vd., 2018). Bunlar ultrases destekli, yüksek hidrostatik basınç destekli, mikrodalga destekli, darbeli elektrik alan destekli (Singh vd., 2023; Ulug vd., 2021), ohmik ısıtma ve kritik altı su ekstraksiyonu (Ulug vd., 2021) yöntemleridir. Şekil 2.1'de biyoaktif peptidlerin üretimi gösterilmiştir (Chauhan & Kanwar, 2020).

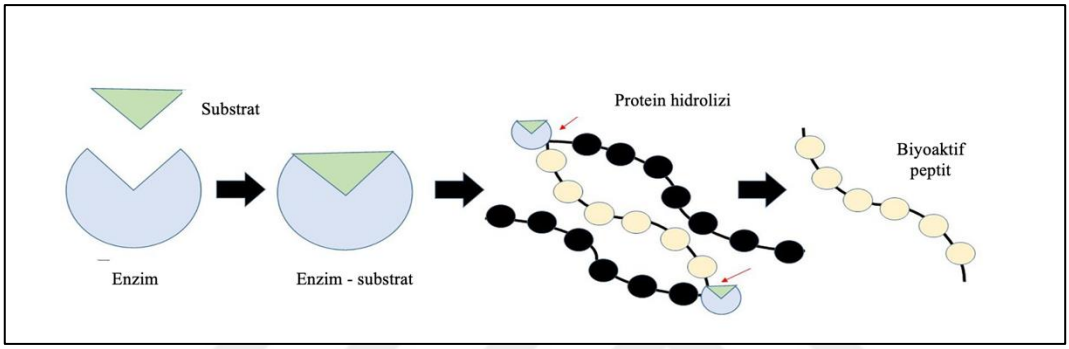


Şekil 2.1 Biyoaktif peptid üretimi (Chauhan & Kanwar, 2020)

2.1.2.1 Enzimatik Hidroliz

Biyoaktif peptidlerin üretiminde kullanılan en yaygın metot enzimatik hidrolizdir (Akbarian vd., 2022). Enzimatik hidrolizde proteinazlar veya peptidazlar olarak da bilinen proteazlar, proteinler ve peptidlerdeki peptid bağlarını parçalarlar (Singh vd., 2023). Enzimatik sentez ile büyük peptid dizileri kullanılarak çok kısa peptid dizileri (2-5 oligomer) elde edilebilir (Chauhan & Kanwar, 2020). Proteinde

bulunan peptid bağlarının parçalanması ve şifrelenmiş peptidin serbest kalmasıyla biyoaktif peptid eldesi gerçekleşir (Cruz-Casas vd., 2021). Enzimatik hidrolizde, enzime uygun sıcaklık ve pH değerinde protein hidrolizi gerçekleşir. Bu yöntemin kısa sürmesi, ölçekleme kolaylığı ve tahminlenebilmesi sayesinde mikrobiyal fermentasyona tercih edilmektedir. Proteinlerin hidrolizinde birden fazla proteolitik enzim kullanılarak kısa peptid dizileri üretilebilir. Ancak, enzimlerin eklenmesi (aynı anda veya sırayla) enzimin optimum pH ve sıcaklığına bağlı olacaktır (Daliri vd., 2017). Şekil 2.2'de enzimatik hidrolizle biyoaktif peptidlerin serbest kalması gösterilmiştir (Cruz-Casas vd., 2021).



Şekil 2.2 Enzimatik hidrolizle biyoaktif peptidlerin serbest kalması (Cruz-Casas vd., 2021)

Katalitik reaksiyonlarına göre peptidazlar yedi kategoriye ayrılır: serin peptidazlar, aspartik peptidazlar, sistein peptidazlar, glutamik peptidazlar, treonin peptidazlar, asparajin peptid liyazlar ve metalopeptidazlar (da Silva, 2017). Proteazlar kaynaklarına göre hayvan, bitki veya mikrobiyal olarak, katalize edilen reaksiyona göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olarak, etki mekanizmasına göre, homoloji ve moleküler yapıya göre sınıflandırılabilir. Tripsin ve pepsin gibi hayvansal, alkalaz, protamex, flavourzyme gibi mikrobiyal, papain ve bromelain gibi bitkisel enzimler biyoaktif peptid üretimlerinde en çok kullanılan ticari enzimatik preparatlardır (Singh vd., 2023). Kullanılan enzimin türüne bağlı olarak biyolojik aktivite ve peptidlerin dizisi değişmektedir (Bhandari vd., 2020). Mikrobiyal enzimler daha avantajlıdır. Üretilen enzimler daha stabildir, daha hızlı üretilirler. Ancak genel olarak enzimlerin yüksek fiyatı, gıda matrislerindeki bazı özelliklere göre düşük etkinliği gibi sınırlamalar bazı yenilikçi yöntemlerin kullanımını ön plana çıkarmıştır (Cruz-Casas vd., 2021). Yüksek hidrostatik basınç, mikrodalga, ultrases ve darbeli elektrik alan gibi yaklaşımlar enzimatik uygulamalar ile kombine

edilerek enzimatik hidrolizi ve biyoaktif peptidlerin üretiminde ekstraksiyonu artırmak için kullanılmaktadır (Mora & Toldrá, 2023).

Gıda proteininin türünden bağımsız olarak, enzimatik hidroliz prosesi genellikle aşağıdaki aşamalardan oluşur: ham madde öğütülür ve su (veya tampon) içerisinde homojenize edilir ardından kullanılacak enzimin optimum değerlerine göre sıcaklık ve pH'nın ayarlaması yapılarak enzim ilave edilir. Son zamanlarda, düşük molekül ağırlıklı peptidlerin üretimini kolaylaştırmak amacıyla ultrasonik destekli hidroliz değerlendirilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra, ısıtma veya pH ayarlaması ile inaktive edilir. Alternatif olarak, reaksiyonu durdurmak ve enzim maliyetlerinden tasarruf etmek amacıyla enzimin sürekli olarak reaksiyon tankına geri döndürüldüğü sürekli membran reaktörü de kullanılabilir. Daha sonra, biyoaktif peptidleri içeren numune, çökeltiden ve lipitlerden ayrılır (örneğin, santrifüjleme/dekantasyon), fraksiyonlara ayrılır ve kurutulur (örneğin, püskürtmeli kurutma yoluyla) (Hajfathalian vd., 2018).

2.1.2.2 Mikrobiyal Fermentasyon

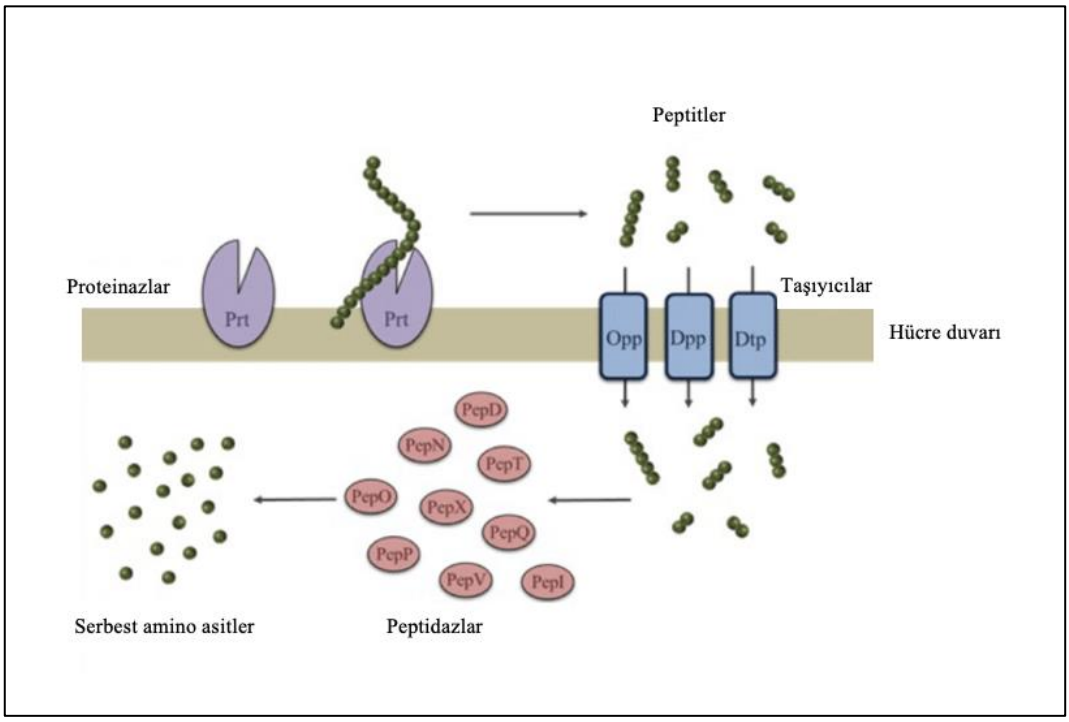
Mikrobiyal fermentasyon biyoaktif peptidlerin elde edildiği biyoteknolojik bir süreçtir. Proteolitik enzim üretebilen mikroorganizmalar bu enzimleri ile proteinleri daha kısa peptidlere parçalarlar. Mikoorganizma olarak genellikle bakteriler, küfler veya mayalar kullanılır. Bunlar substratta doğrudan bulunabilir veya starter kültür olarak eklenebilirler (Cruz-Casas vd., 2021). Fermente ürünlerden elde edilen peptidler, elde edildikleri ham maddelerle karşılaştırıldığında daha yüksek biyoaktiviteye sahiptir. Bu durum peptidlerin boyutu ve dizisine ek olarak amino asit bileşimindeki değişikliğe bağlanmaktadır (Hajfathalian vd., 2018).

L. helveticus, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactococcus (Lc.) lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ve *S. salivarius* ssp. *thermophilus* dahil olmak üzere literatürde pek çok mikroorganizmanın protein hidrolizi ve biyoaktif peptidlerin salınmasını sağlayan etkili bir proteolitik sistemi olduğu belirtilmiştir (de Castro & Sato, 2015). Biyoaktif peptid üretiminde bakterilere ek olarak, mayalar ve filamentli fungiler de kullanılmaktadır (Bersi vd., 2018). Proteolitik prosesi hızlandırmak için farklı bakteriler hatta maya ve bakteriler beraber kullanılabilir (Daliri vd., 2017).

Enzimatik hidrolize kıyasla, mikrobiyal fermentasyon ile biyoaktif peptid üretimi daha ucuz bir işlemdir. Kültür maliyetleri nispeten düşük olmakla birlikte, LAB'lerin protezlarının gıdalarda kullanılması güvenli olarak kabul edilir. Hücre zarı üzerinde LAB proteazları eksprese edilir, böylece saflaştırma kolaylaşır. Bu nedenle bu üretim yöntemine dayalı pek çok ticari ürün bulunmaktadır (Bersi vd., 2018).

- **Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi**

Ekstrasellüler proteoliz, sütte gelişen çoğu LAB'de genellikle hücre duvarı ilişkili proteinaz veya proteazı olarak adlandırılan enzimlerin varlığıyla mümkün olmaktadır. Tüm LAB'lerde proteoliz üç aşamadan oluşur. Birinci olarak hücre duvarı ilişkili proteinaz, kazeini oligopeptidlere hidroliz eder, hücre bunları bu aşamada nitrojen kaynağı olarak kullanamaz, ikinci olarak oligopeptidler spesifik taşıyıcılar ile hücre içine taşınır, üçüncü olarak ise hücre içi peptidazlarla oligopeptidler serbest amino asitlere ve düşük molekül ağırlıklı peptidlere dönüşür (Juillard vd., 2022). Genel aminopeptidazlar (PepN ve PepC) ve X-prolil dipeptidil aminopeptidaz (PepX), oligopeptidler üzerine etki eden ilk enzimlerdir. Ayrıca, LAB'den çeşitli endopeptidazlar karakterize edilmiş ve isimlendirilmiştir (Savijoki vd., 2006). Şekil 2.3'te LAB'nin proteolitik sistemi gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi (Higgins, 1998)

LAB'lerde bulunan CEP'ler beş farklı türü klonlanmış ve karakterize edilmiştir. PrtB *L. bulgaricus*'dan, PrtH *L. helveticus*'dan, PrtP *L. paracasei* ve *Lc. lactis*'den, PrtR ise *L. rhamnosus*'dan izole edilmiştir. LAB'ler genellikle yalnızca bir CEP'ye sahiptir ancak *L. helveticus* ve *L. bulgaricus* suşlarında iki CEP'nin varlığı rapor edilmiştir. Laktokoklarda prtP genleri plazmid veya genom tarafından kodlanabilirken, laktobasillerden karakterize edilen CEP'ler genom tarafından kodlanır. LAB'lerin sahip olduğu CEP'lerin üretimi ve aktivitesi, sıcaklık, karıştırma, pH, oksijen varlığı gibi çeşitli fermentasyon koşullarından etkilenmektedir (Agyei vd., 2013). Bu nedenle fermentasyon koşullarını optimize etmek, biyoaktif peptidlerin üretimini artırmak açısından önemlidir (Martinez-Villaluenga vd., 2017).

2.1.2.3 Kimyasal Hidroliz

Asit veya alkaliler ile yapılan kimyasal hidroliz ucuz ve basit olmasından dolayı proteinlerin hidrolizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Serbest amino asit ve peptidlerin üretimi için peptid bağlarını parçalamakta kullanılan kimyasal hidroliz, değişken kimyasal bileşimlerle sonuçlanması, süreci kontrol etmedeki sıkıntılar gibi bazı sınırlamalara sahiptir. Aşırı sıcaklık ve pH koşulları altında güçlü kimyasallar ve çözücülerle hidroliz, zayıf besinsel niteliklere ve düşük işlevselliklere neden olur (Ulug vd., 2021). Bu yöntemle teorik olarak, saflaştırılmış proteinler veya peptidlerdeki amino asit bileşimi, dizi analizlerinden elde edilebilir, ancak bu yöntem, hayvansal dokularda veya çeşitli gıdalarda doğal olarak oluşan, karmaşık protein ve peptid karışımları için mümkün değildir (Dai vd., 2014).

Asidik hidroliz, proteinlerdeki peptid bağını parçalamak için kullanılan en önemli tekniktir. Uzun bir süre önce geliştirilmiş olmasına ragmen hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein hidrolizi 6 M HCl kullanılarak 110 ℃'de 24 sa boyunca gerçekleştirilir (Mustăţea vd., 2019). Bu hidroliz sonucunda asparajin aspartik aside, glutamin glutamik aside tamamen hidrolize olur. Asitle hidroliz edilmiş örneklerde sistein doğrudan tespit edilemez. Triptofan tamamen yok edilir. Kısmi olarak treonin ve serin hidroliz olur. Çoğunlukla serin için %10'luk, treonin için %5'lik bir kayıp olur. Alkali hidrolizi ise çoğunlukla bazik koşullar altında stabil olan triptofanın belirlenmesi için kullanılır. Treonin, sistein, arjinin ve serinin yok

olması bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Bu yöntemde çoğunlukla KOH ve NaOH kullanılmakla birlikte, nadir olarak baryum hidroksit kullanılır (Fountoulakis & Lahm, 1998).

2.1.2.4 Rekombinant DNA Teknolojisi

Mikrobiyal hücreler tarafından spesifik protein ve peptidlerin veya bunların öncüllerinin oluşturulması için kullanılan bir diğer yöntem rekombinant DNA teknolojisidir. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde spesifik biyoaktif peptidlerin üretimi ve verimi artmaktadır. İki tür strateji kullanılabilir: birincisi, *Escherichia coli* gibi iyi bilinen bir bakteri kullanılarak biyoaktif peptidin üretilmesi ve ardından gıda matrisine peptid eklenmesinden oluşur; ikincisi, biyoaktif peptidi doğrudan gıda ürününde sentezlemek için LAB kullanmaktır. İkinci durumda, bu strateji genetiği değiştirilmiş organizmaların gıdada kullanılması anlamına gelmektedir (Hafeez vd., 2014).

2.1.2.5 Yeni İşleme Yöntemleri

Yüksek hidrostatik basınç (YHB) destekli işleme, enzimatik hidrolizin verimliliğini artırmak ve çeşitli karmaşık gıda substratlarından peptid fraksiyonları üretmek için termal olmayan bir yaklaşımdır (Singh vd., 2023). YHB'ta 100-1000 MPa arasında izostatik basınç kullanılır ve basıncı iletmesi için kullanılan ortam sudur (Ulug vd., 2021). Basınç proteinler üzerinde etki yaratarak proteinlerin açılmasına sebep olur ve enzimlerin erişim bölgeleri açığa çıkar. Böylece enzimatik hidrolize duyarlılık artabilir. Bu nedenle enzimatik hidrolizden önce proteinin YHB ile ön işleme tabi tutulması gerekir. YHB altında gerçekleştirilen protein hidrolizi biyoaktif moleküller üretmek için verimli, yenilikçi ve çevreci bir strateji olabilir (Marciniak vd., 2018). Soya protein izolatına uygulunan YHB ve enzimatik hidroliz sonucunda antioksidan ve ACE-inhibitör aktivitenin artırdığı tespit edilmiştir (Guan vd., 2018). Serum protein izolatına uygulanan YHB ve enzimatik hidroliz sonucunda inflamasyonun ve oksidatif stresin azaldığı tespit edilmiştir (Piccolomini vd., 2012). β-laktoglobuline uygulanan YHB ve enzimatik hidroliz sonucunda da biyoaktif peptid veriminin arttığı belirtilmiştir (Boukil vd., 2018). Fasulye (Al-Ruwaih vd., 2019; Garcia-Mora vd., 2016), keten tohumu proteini izolatı (Perreault vd., 2017), tatlı patates (Zhang & Mu, 2017), YHB'nin enzimatik hidrolizle birlikte kullanıldığı ve biyoaktif özellikleri artırdığı belirtilen diğer protein kaynaklarıdır.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), peptid üretimi için ultrasonik dalgaların (20 kHz'in üzerinde) kullanıldığı bir başka çevre dostu yöntemdir. Ultrases, ortamda ilerleyen mekanik dalgaya bağlı, ve termal olmayan bir teknolojidir (Ulug vd., 2021). Ultrason teknolojisinin ön işlem olarak veya hidroliz sırasında kullanımının, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri etkilediği, kavitasyon oluşturarak, proteinlerin dördüncül ve/veya üçüncül yapısını bozduğu ve bu şekilde protein formun değişebileceği öne sürülmüştür. Sonuç olarak, bu yapısal değişiklikler enzimin daha fazla hidroliz bölgesine erişmesine izin vererek hidroliz derecesini ve biyoaktiviteyi artırabileceği belirtilmiştir (Singh vd., 2023). Süt protein konsantresinde yapılan çalışmada ACE-inhibitör aktivitenin (Uluko vd., 2013) ve radikal süpürme aktivitesinin (Uluko vd., 2015) arttığı tespit edilmiştir. Serum proteinleri için yapılan çalışmada daha yüksek ACE-inhibitör ve immünomodülatör aktivite tespit edilmiştir (Wu vd., 2018). Yine serum proteinlerinde yapılan bir çalışmada ultrases ve enzim uygulamasından sonra molekül ağırlığı 5 kDa'dan küçük olan peptidlerin konsnatrasyonu daha yüksek bulunmuş ve ACE-inhibitör aktivitenin kontrole göre arttığı belirlenmiştir (Abadía-García vd., 2021). Bir diğer çalışmada süt proteinlerine uygulanan ultrases ve enzimatik hidroliz sonucu daha yüksek ACE-inhibitör aktivitesi elde edilmiştir (Abadía-García vd., 2021). Kolza tohumu (Wali vd., 2017) ve mısır (Liang vd., 2017) ultrases ve enzimatik hidrolizin uygulandığı ve biyoaktif özelliklerin arttığı diğer protein kaynaklarındandır.

Mikrodalgalar 300 MHz–300 GHz aralığındaki elektromanyetik radyasyonu kapsar (Murtaza vd., 2022). Mikrodalga destekli ektsraksiyonda iyonik iletim ve dipol rotasyon yoluyla moleküler hareket üretmek için mikrodalga enerjisi kullanılır. Bu yöntemin gıdalardan biyoaktif peptid üretimi için yararlı bir teknoloji olduğu belirtilmiştir. Mikrodalga destekli ektsraksiyon biyoaktif peptidlerin üretiminde enzimlerle birlikte kullanılır ve proteinlerin parçalanma bölgelerinin açığa çıkararak proteinlerin hidrolizini artırmakta ve proteinlerin hızlı parçalanmasını sağlanmaktadır (Singh vd., 2023). Artan proteliz ve daha düşük molekül ağırlıklı peptidlerin oluşumu nedeniyle biyoaktiviteyi artırmaktadır (Ulug vd., 2021). Süt protein konsantersinde mikrodalga ve enzim uygulaması radikal süpürme aktivitesini kontrole göre iyileştirmiştir (Uluko vd., 2015). Çedar peynirinde yapılan bir çalışmada, antioksidan ve ACE-inhibitör aktivitenin arttığı görülmüştür

(Munir vd., 2020). Sığır serum albumin (Chen vd., 2014) ve serum proteini konsantresinde (Izquierdo vd., 2008) ise mikrodalga ve enzim uygulaması ile enzimatik hidrolizin iyileştirildiği belirtilmiştir.

Darbeli elektrik alanı (DEA), biyoaktif peptidlerin üretimi için giderek artan bir uygulamaya sahiptir. DEA termal olmayan, yeşil bir teknolojidir. 2 elektrot arasına gıda maddesi yerleştirilir ve kısa darbelerle (< 1 s) yüksek yoğunlukta (10–80 kV/cm) uygulanır. DEA, hücre zarı üzerinde geçirgenliğini artırarak proteinlerin ekstraksiyonunu kolaylaştırır. Bu uygulamayla hidrojen bağlarında ve hidrofobik etkileşimlerde değişiklikler olur ve proteazların aktivitesi artarak antioksidan ve ACE-inhibitör aktivitesinde artışa katkıda bulunur (Mora & Toldrá, 2023). Bu teknolojinin biyoaktif peptidlerin biyolojik aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Singh vd., 2023). Bir çalışmada yumurta beyazından elde edilen peptidlerin antioksidan aktivitesinin DEA uygulamasıyla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Lin vd., 2013). DEA uygulanan sütten üretilen peynirin toplam peptid içeriğinin arttığı tespit edilmiştir (Yu vd., 2012).

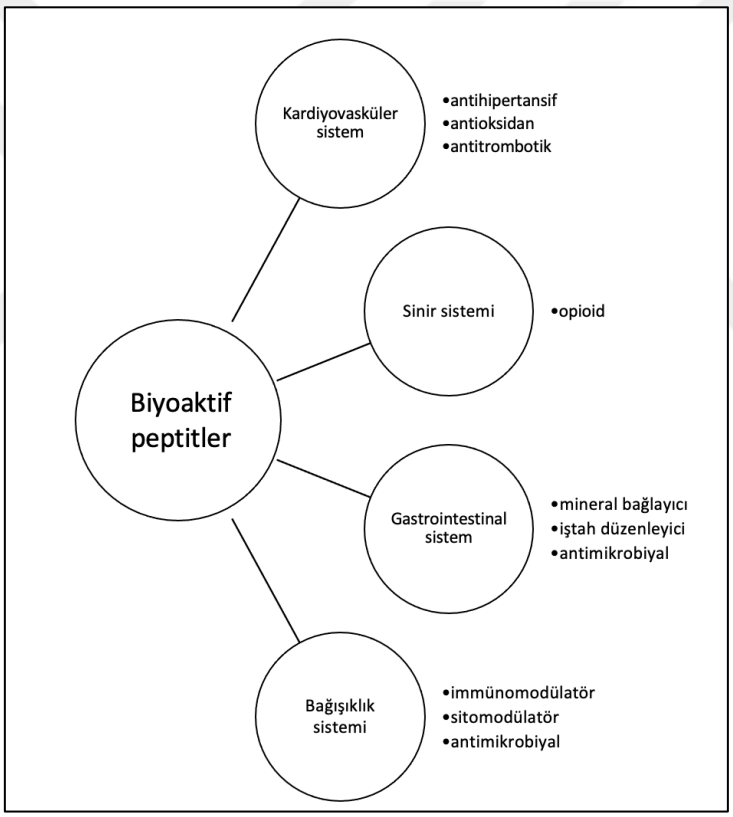
Basınçlı sıcak su olarak da adlandırılan kritik altı su, suyun sıvı durumunu korumayı sağlayan yeterli basınç (yaklaşık 220-230 bar) altında 100 ila 370 °C arasındaki kritik altı bölgedeki sudan oluşur. Organik solvent içermediğinden yeşil bir teknolojidir. Kritik altı su, yüksek ekstraksiyon oranları ve ardından enzimatik hidroliz ile ön arıtma olarak kullanılmıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar 200-250°C aralığında ve 10 MPa'ya kadar basınçta kritik altı suyun enzimatik hidrolize alternatif bir yol olarak biyoaktif peptidlerin salınması için eş zamanlı ekstraksiyon ve hidroliz için kullanıldığını belirtmektedir. Kullanılan yüksek sıcaklık ve basınç, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimlerin bozulmasınına neden olur. Bu durum, spesifik olmasa da peptid bağının hidrolizini kolaylaştırır (Mora & Toldrá, 2023). Bu yöntem ön işlem olarak enzimatik yöntemle combine edildiğinde soya protein hidrolizatlarının antioksidan ve kalsiyum bağlama özelliklerini artırdığı tespit edilmiştir (Wang, Lu, vd., 2017).

Ohmik ısıtma, gıda maddesinin elektriksel direnç görevi gördüğü ve elektrik akımı geçirilerek ısıtıldığı termal bir işlemdir. Proteinlerin açılmasını ve denatüre edilmesini sağladığından protein agregasyonunu ve jelleşmesini teşvik etmek için ohmik ısıtma uygulanmıştır (Ulug vd., 2021). Soya sütüne uygulanmasıyla serbest amino asit içeriği arttığı bildirilmiştir (Pereira vd., 2021). Düşük elektrik yoğunluğu

uygulandığında peynir altı suyunun ACE-inhibitör ve antioksidan aktivitesinin arttığı, uygulanan yoğunluğun artmasıyla bu etkilerin azaldığı belirlenmiştir (Costa vd., 2018). Ancak, peptidlerin üretiminde ohmik ısıtmanın kullanımı ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği belirtilmiştir (Ulug vd., 2021).

2.1.3 Biyoaktif Peptidlerin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Gıdalardan elde edilen birçok BP'nin birden fazla biyolojik etkisi olabileceği ve terapötik aktiviteye sahip özellikleri olduğu belirtilmiştir (Mahgoub vd., 2023). Şekil 2.4'te süt kaynaklı biyoaktif peptidlerin farklı sistemler üzerindeki fizyolojik özellikleri gösterilmiştir (Korhonen & Pihlanto, 2006).



Şekil 2.4 Süt kaynaklı biyoaktif peptidlerin fizyolojik özellikleri (Korhonen & Pihlanto, 2006)

2.1.3.1 ACE-İnhibitör Aktivite

Hipertansiyon, dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birini etkilemektedir ve kardiyovasküler hastalıklar ve buna bağlı komplikasyonlar açısından önemli ancak kontrol edilebilir bir risk faktörüdür (Hartmann & Meisel, 2007).

ACE bir peptidil di-peptidaz enzimidir ve anjiyotensin I'i damar daraltıcı bir peptid hormonu olan anjiyotensin II'ye dönüştürerek kan basıncının düzenlenmesini sağlayan substratın karboksil terminal ucunu parçalayabilmektedir. Bu durum aldosteron salınımını uyarır. Sodyum konsantrasyonu yükselir ve kan basıncı artar. Ancak antihipertansif peptid, kan basıncındaki artışı kontrol etmek için ACE'yi inhibe edebilir (Mohanty vd., 2016). Süt peptidlerinin ACE-inhibitör aktivitesi ile igili yapılan çalışmaların çoğunda inek sütü proteinleri kullanılmıştır (Abdel-Hamid vd., 2017). Süt kaynaklı pek çok biyoaktif peptid, spesifik olarak ACE'yi inhibe eder ve arteriyel basıncı azaltabilir (Shukla vd., 2023).

ACE inhibitörleri, C-terminal uçlarında prolin, lizin veya arjinin içeren peptidlerdir. *L. helveticus, Lc. lactis* gibi LAB'nin aktivitesiyle elde edilen serum proteinleri, sindirim sistemi endo-peptidazlarına karşı dirençlidir, dolayısıyla kan dolaşımına kolayca emilebilir. β-kazein, κ-kazein gibi ACE inhibitör peptidler, süt proteinleri α_{s1} ve β-kazeinin enzimatik sindiriminden izole edilmiştir (Mohanty vd., 2016).

Diğer LAB'lere göre *L. helveticus* yüksek hücre duvarı ilişkili proteinaz aktivitesine sahiptir ve fermente sütten yüksek miktarda ve çeşitlilikte peptid açığa çıkarma yeteneğine sahiptir. *L. helveticus* tarafından en iyi karakterize edilmiş ACE inhibitörü ve antihipertansif peptidler *Saccharomyces cerevisiae* ile birlikte veya tek başına ürettiği laktotripeptidler olan Ile-Pro-Pro ve Val-Pro-Pro'dur (Fitzgerald & Murray, 2006).

2.1.3.2 Antioksidan Aktivite

Serbest radikaller membran proteinlerine, lipitlere ve DNA'ya saldırarak kanser, inflamatuar hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Sentetik antioksidanların böbrekler, karaciğer ve akciğerlerdeki potansiyel kanserojen etkileri gibi potansiyel riskleri, biyoaktif antioksidan peptidlerin araştırılmasını yoğunlaştırmıştır (Daliri vd., 2018).

BP'ler serbest radikallere karşı güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Antioksidan özelliğe sahip olan peptidler çoğunlukla 5-16 amino asitten oluşurlar (Akbarian vd., 2022). Proteinlerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki amino asitlerden ve proteliz sonucu serbest kalan biyoaktif peptidler sayesindedir (Öztürk & Akın, 2020). Hidrolize uğramış peptidlerin ve proteinlerin, metal iyonlarını şelatlama veya

enzimatik serbest radikalleri uzaklaştırma yoluyla enzimatik ve enzimatik olmayan oksidasyonu engellediği ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Antioksidan kapasiteye sahip protein bileşenlerinde çeşitli peptidler bulunmuş ve bunların biyolojik aktiviteleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Serbest radikallerin (hidroksil gibi) enerjisi yüksek olmasına rağmen genel olarak proteinlerde bulunan 20 amino asidin tamamı serbest radikallerle iç etkileşime girebilir. Yapıları, bileşimleri ve hidrofobik olmaları peptidlerin antioksidan karakterleri ile ilişkilidir (Akbarian vd., 2022). Kazein ve serum protein kaynaklı pek çok peptid antioksidan özelliğe sahiptir. Kazein kaynaklı pek çok peptid demir, çinko, kalsiyum ile etkileşime girmesini ve katyon şelatörü özelliğini göstermesini sağlayan spesifik amino asit dizisine sahip olan fosforile serin kalıntılarına sahiptir. Kazeinin polar bölgelerinde bu spesifik dizi bulunmaktadır. Serum proteinleri ise gıda ve ilaç endüstrilerinde yaygın kullanımlarına olanak tanıyan çok yönlü fonksiyonel özelliklere ve yüksek biyolojik değere sahiptir. Serum proteinleri hidrolizatları ve serum proteinlerinden türetilen peptidler, güçlü antioksidan aktivite gösterir. Serum proteinleri ve hidrolizatlarının antioksidatif özelliğini sağlayan amino asitlere lösin, histidine, metiyonin, tirozin, sistein, izolösin, prolin, fenilalanin, triptofan örnek olarak verilebilir (Kumar vd., 2017).

2.1.3.3 Antitrombotik Peptidler

Antitrombotik, vücutta kan pıhtılarının oluşmasının veya büyümesinin önlenmesi anlamına gelir. Trombotik aktivitelere, hiperreaktif trombositler, fibrinojen seviyesinin artışı ve düzensiz fibrinoliz sebep olur. Fibrinolizi artırmak ve trombosit agregasyonunu azaltmak amacıyla kullanılan antitrombotik ilaçların pek çok yan etkisi bulunmaktadır. Fibrinojenin trombin ile etkileşimi ile karakterize edilen kanın pıhtılaşmasında yer alan mekanizma ile süt pıhtılaşmasında yer alan ve k-kazeinin kimozin ile etkileşimini içeren mekanizma birbirleriyle benzerlik göstermektedir. Triptik hidrolizatlardan izole edilen κ-kazein fragmanı, antitrombotik etki gösterir. Böylece trombosit bağlayan fibrinojen aktivitesini inhibe eder. Bu peptidler gastrointestinal sindirim sırasında serbest kalır ve kana kolayca karışır, bu da peptidlerin *in vivo* antitrombotik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (Bhandari vd., 2020).

2.1.3.4 Antidiyabetik Aktivite

Diyabet dünya çapında yaklaşık 400 milyon insanı etkileyen kronik bir hastalıktır. Bu hastalık ya insülin salgılayan pankreatik beta hücrelerinin otoimmün tahribatı sonucu (tip 1 diyabet) ya da periferik organlardaki insülin direncinin sonucu olarak insülin salgılanmasında düzensizlik ve beta hücrelerinin başarısızlığı (tip 2 diyabet) sonucunda ortaya çıkar (Vargas-Bello-Pérez vd., 2019). Diyabetin tedavisinde α-glukosidaz inhibitörleri, α-amilaz inhibitörleri ve dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibitörleri kullanılmaktadır (Patil vd., 2020). Süt ürünlerinin insülin salgılanması ve glisemik kontrol üzerindeki faydaları insülin salgılanmasını uyaran yüksek miktardaki esansiyel amino asitler ve biyoaktif peptidlere, makro besinlerin ve mikro besinlerin spesifik kombinasyonlarına ve peynir ile yoğurtta bulunan benzersiz probiyotik türlere ve biyoaktif peptidlere atfedilir (Pasin & Comerford, 2015). Süt proteinleri, özellikle süt proteininden türetilen peptidler ve amino asitler, normoglisemik ve tip 2 diyabetik kişilerde postprandiyal glisemi ve insülin salgısının düzenlenmesiyle bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Mahmoud & Sameh, 2019). Yapılan çalışmalar peynir altı suyu proteinlerinden izole edilen dipeptidlerin ve tripeptidlerin, substratın DPP-IV aktif bölgesine erişimini önleyen rekabetçi inhibitörler olarak görev yapabileceğini ve dolayısıyla katalizi azalttığını öne sürmüştür (Gunnarsson vd., 2006).

2.1.3.5 Opioid Aktivite

Opioid peptidler, süt ürünlerinde bulunan ve sinir sisteminin işleyişinde aktif rol oynayan peptidler olarak tanımlamıştır. Opioid BP, afyona (morfine) farmakolojik olarak benzerlik göstermektedir. Bu peptidler, beyindeki opiatların etkisini taklit eden kısa amino asit dizilerine sahiptir (Teschemacher vd., 1997). Bu peptidlerin sınıflandırılması, opioid agonistleri veya antagonistleri olarak biyoaktivitelerine bağlı olarak gerçekleştirilir (Hartmann & Meisel, 2007). Gıdadan türetilen bu peptidlerin çoğu, süt proteinleri α-, β- veya κ-kazein, α-laktalbumin, β-laktoglobulin veya laktoferrin parçalarıdır. Bu bileşiklerin çoğu opioid agonist aktivitesi gösterir, yalnızca çok azı opioid antagonistleri gibi davranmaktadır (Kamau vd., 2010). β-kazeinden türetilen β-kazomorfinler ve özellikle β-kazomorfin-5 (BCM5) ve β-kazomorfin-7 (BCM7) en iyi bilinen opioid peptidlerdir. Bunlar beyindeki opioid reseptörlerine bağlanan peptidlerdir (Hartmann & Meisel, 2007). Sırasıyla κ-kazein ve laktoferrinin peptik

sindiriminden türetilen, kazoksinler ve laktoferroksinler olarak adlandırılan opioid antagonistleridir (Kamau vd., 2010).

2.1.3.6 Mineral Bağlayıcı Aktivite

Bağırsak pH'sında Ca, P ve çözeltideki diğer minerallerle bağlanarak kompleks oluşturan özel dizilime sahip birkaç peptid vardır. Bu peptidler yüksek derecede anyonik karaktere sahiptir. Bu özellik sayesinde protelize daha dirençli hale gelerek minerallerle çözünmeyen komplekslerin oluşumunu önlenir. Ser-P:Ser-P:Ser-P:Glu-IleVal dizilimine sahip peptidler α_{S1}-kazeinden izole edilen peptidlerdir. Süt kazeinleri fosfat ve kalsiyum iyonlarını stabilize etmektedir. Süt proteinlerinin enzimatik sindirimi sonucu çeşitli fosfopeptidler tanımlanmıştır. α_{S1}-kazein üç fragman, α_{S2}- kazein iki fragman ve β-kazein dört fragman içerir. Kazein proteinleri sindirildiğinde, CPP'ler fosforile seril kalıntıları kümesi içeren N-terminal polar alanından salınır ve kalsiyum fosfat ile kazein arasındaki etkileşimi sağlar. Bunun sonucunda kazein miseli oluşur. Bu fosforillenmiş peptidler kalsiyum ve fosfat iyonlarına bağlanır, böylece biyoyararlanımları artmış olur (Bhandari vd., 2020). CPP'lerin mineral bağlama özelliğinden dolayı osteoporoz, diş çürükleri, hipertansiyon ve aneminin önlenmesinde fizyolojik olarak faydalı oldukları düşünülmektedir (Dhaval vd., 2016).

Biyoyaralanımı sağlamasının dışında diğer önemli bir özellik ise peptidlerin metaller ile kompleks oluşturup, metallerin pro-oksidan özelliğini azaltmasıdır. Fe metalinde Fe^{2+} durumundan Fe^{3+} durumuna geçme yeteneği Fe katalizli reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla ilişkilidir; bu durum membran lipitlerinin peroksidasyonuna ve DNA yapısında hasara neden olabilir. Ayrıca ROS'un gıda ürünlerinin lezzeti, dokusu, besin değeri ve raf ömrü üzerinde olumsuz etkisi vardır. Hem gıdada hem de organizmada lipit oksidasyonu üzerindeki etkisini en aza indirgemek ve serbest Fe'nin yan etkilerini önlemek amacıyla Fe'nin kompleks formunda kullanımına odaklanılmıştır. Bazı kompleksleşme süreçleri Fe'nin redoks potansiyelini önleyebilir ve böylece örneğin Fenton reaksiyonu yoluyla serbest radikaller ve/veya ROS üreten katalitik reaksiyonlara katılmasını önleyebilir. Bu nedenle, gıda takviyesi için araştırmalar hem gıdada hem de organizmada lipit oksidasyonu üzerindeki etkisini en aza indirgemek ve serbest Fe'nin yan etkilerini önlemek amacıyla Fe'nin kompleks formunda kullanımına odaklanmıştır (Caetano-Silva vd., 2021). Takviye edilmiş sütte yapılan çalışmalar Fe reaktivitesini azaltma

ve Fe'yi bağlayarak oksidasyonu etkileme potansiyeli olduğunu göstermektedir (Hegenauer vd., 1979; Hekmat & McMahon, 1998). Serum peptidleriyle yapılan bir çalışmada su içinde yağ emülsiyonun oksidatif stabilitesinin serum peptidleri-Fe kompleksi sayesinde arttığı belirtilmiştir (Caetano-Silva vd., 2018).

2.1.3.7 İştah Düzenleyici Aktivite

Bu peptidler iştahı bastırarak kilo alımını ve obeziteyi önleme işlevi görebilir (Jayathilakan vd., 2018). Gastrointestinal sindirim sırasında proteinlerden salınan biyoaktif peptidlerin bağırsakta tokluk sinyallerini başlatması ve gıda tüketiminin azalmasıyla proteinlerin kilo kaybındaki etkisini açıklayabilir (Öztürk & Akın, 2020). Diyetteki serum proteini, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolün düşürülmesiyle ve ayrıca iştah bastırıcı bir hormon olan kolesistokinin (CCK) salınımının artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Jayathilakan vd., 2018). CCK iştah kontrolünde önemli bir endokrin faktörüdür (Nishi, Hara, & Tomita, 2003). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada gastrik sindirim sırasında salınan glikomakropeptidin, yani kazeinomakropeptidin glikozillenmiş formlarının, bağırsak hücreleri tarafından CCK salınımının uyarılması yoluyla doyurucu etki sağladığı tespit edilmiştir (Beucher vd., 1994). Yapılan bir başka çalışmada VRIRLLQRFNKRS amino asit dizisine sahip soya fasülyesinin β-konglisin fragmanının CCK salınımını uyararak anoreksijenik etkiden sorumlu belirtilmiştir (Nishi, Hara, Asano, vd., 2003). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada β-konglisin'in gıda alımını baskıladığı belirtilmiştir (Nishi, Hara, & Tomita, 2003).

2.1.3.8 Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal peptidlerin (AMP) çeşitli virüs, maya ve bakteriler üzerinde doğrudan etkiye sahip oldukları ve pek çok antimikrobiyal peptidin immünomodülasyon, antioksidan aktivite ve yara iyileştirme aktivitesi gibi farklı ek biyoaktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu özellikler sayesinde AMP'ler, patojen bakterilere karşı direnç gösteren antibiyotiklere kıyasla önemli alternatifler haline gelmektedir. Uzunluk olarak 12-50 amino asit arasında bulunan AMP'ler, disülfür bağlarının yükü ve konumu, amino asit dizilimi açısından farklılık gösterir. AMP'lerin mikroorganizmalarla etkileşime girmesi, pozitif bi yükün varlığı veya hem hidrofilik hem de hidrofobik amino asitlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Katyonik bir AMP'nin antimikrobiyal potansiyelinin, peptidin yükü, hidrofobikliği

ve uzunluğu ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. AMP'ler, mikrobiyal hücrelerin içindeki makromoleküllerle etkileşime girerek veya hücre zarında gözenekler oluşturarak mikroorganizmaları doğrudan öldürebilir (Daliri vd., 2018). Mikroorganizmaların yüzeyinde anyonik lipitler bulunmaktadır. AMP'ler ile bu anyonik lipitler elektrostatik etkileşim olur. Bu antimikrobiyal aktivite için en etkili mekanizmadır. Gram-negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkaritler veya Gram-pozitif bakterilede bulunan teikoik asit ile katyonik peptid arasında bir çekim olur. Hücre yüzeyinden Mg^{2+}, Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar uzaklaşır, dış membran destabilize olarak peptidin hücre içine girişi gerçekleşir. Bu peptid daha sonra sitoplazmik membran ile temas eder. Peptidlerin hidrofobik yapıda olması bu etkileşimi kolaylaştırmaktadır (Dhaval vd., 2016).

Sütün antimikrobiyal aktivitesini ortaya koymak için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (Peighambardoust vd., 2021). Süt peptidlerinin antimikrobiyal aktiviteleri, patojen mikroorganizmaların tutunmasını veya istilasını önleyenlerden, mikrobiyal gelişmeyi engelleyenlere kadar çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir (Hernández-Ledesma vd., 2014).

Laktoferrin, laktoferrisin, α-laktalbumin, β-laktoglobulin gibi birçok serum proteininin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda antibakteriyel fragmentler α_{s1}-kazein, α_{s2}-kazein, β-kazein ve κ-kazeinden de türetilmiştir. Çalışmalar, bu peptidlerin çok çeşitli patojen bakterilere (örneğin; *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Staphylococcus*), maya ve filamentli mantarlara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Jabbari, Hasani, Kafilzadeh & Janfeshan, 2012).

2.1.3.9 İmmünomodülatör Aktivite

İmmünomodülatör peptidler, konağın savunma yanıtını değiştiren veya artıran ve sonuçta vücudu bir patojenin istilasından koruyan spesifik protein parçalarıdır (Manzoor vd., 2022). İmmünomodülatör peptidler bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını ve olgunlaşmasını artırır, "doğal öldürücü hücre" aktivitesini ve makrofaj fagositozunu uyarır, antikorların, kemokinlerin ve sitokinlerin sentezini düzenler ve inflamatuar bileşikleri etkisiz hale getirir (Maestri vd., 2016). Bu tür etkilere, biyoaktif peptid dizisinin hedef hücrenin yüzeyindeki spesifik reseptörlerle etkileşimi aracılık eder. Ayrıca, peptidlerin amino asit bileşimi, dizi sıralamasının

ve uzunluğunun immünomodülatör aktiviteleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Etkili bir immünomodülatör aktivite için, bir peptid dizisi bir veya daha fazla tirozin, triptofan, glutamin, glutamik asit, sistein, asparajin ve aspartik asit kalıntısı içeren hidrofobik amino asitlere sahip olmalıdır (Chalamaiah vd., 2018). α_{s1}- ve β-kazeinden elde edilen immünopeptidlerin, fare ve insan makrofajlarının fagositik aktivitelerini uyardığı belirtilmiştir. Peptid konsantrasyonuna bağlı olarak, β-kazokinin ve β-kazomorfinin lenfosit proliferasyonunun hem baskılandığı hem de uyardığı gösterilmiştir (Gobbetti vd., 2002).

2.1.3.10 Sitomodülatör Aktivite

CPP'lerin sitomodülatör etkiler sergilediği bildirilmiştir. Kazein fraksiyonlarından elde edilen bu peptidler kanser hücresi büyümesini inhibe edebilir ya da immunokompetan hücrelerinin ve yenidoğan bağırsak hücrelerinin aktivitesini uyarabilir. Kazein türevi peptidler, farklı insan hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz gibi hücre canlılığını modüle edebilir (Park & Nam, 2015).

2.1.3.11 Multifonksiyonel Aktivite

Süt kaynaklı birçok peptid çok işlevli özelliklere sahiptir. Kazeinin birincil yapısındaki bölgeler, farklı biyolojik etkiler gösteren üst üste binen peptid dizileri içerir. Stratejik bölgeler olarak kabul edilen bu bölgeler, daha fazla proteolitik bozulmaya karşı kısmen korunmaktadır. Örneğin, çoğu β-kazomorfin ve kazokinin hem ACE inhibitörü hem de immün sistemi uyarıcıdır ve α- ve β-laktorfin, hem opioid hem de ACE inhibitör aktivitelerine sahip diziler içerir (Gobbetti vd., 2002). Bu peptidlerin sergilediği çoklu biyoaktiviteler, birden fazla hastalık hedefinin veya kardiyovasküler hastalık gibi bir hastalığın birden fazla semptomunun iyileştirilmesine yönelik etkilerini artırabilir, çünkü birçok hastalık etiyoloji ve ilerleme açısından birbiriyle ilişkilidir. Bu nedenle, biyoaktif gıda proteini hidrolizatlarının üretilmesi ve işlenmesine yönelik koşullar, insan sağlığının korunmasında çeşitli uygulamalara sahip çok işlevli peptidler elde etmek için dikkatlice tasarlanabilir (Udenigwe & Aluko, 2012). Tablo 2.1'de bazı fermente süt ürünlerinin biyoaktivitelerine örnekler verilmiştir (Hafeez vd., 2014)

Tablo 2.1 Fermente süt ürünlerinin biyoaktiviteleri (Hafeez vd., 2014)

Fermente ürün	Biyoaktivite	Referanslar
Ticari yoğurt	Antihipertansif	Kunda vd. (2012)
Ticari ve geleneksel yoğurt	Antioksidan	Şanlıdere Aloğlu and Öner (2011)
Probiyotik yoğurt	Antioksidan Antidiyabetik	Ejtahed vd. (2012)
Yağsız yoğurt	Antibakteriyel	Petti vd. (2008)
Probiyotik yoğurt	Demineralizasyonu inhibe eden ve mine çürüklerinin remineralizasyonunu teşvik eden aktivite	Ferrazzano vd. (2008)
Serum proteinleriyle zenginleştirilmiş yoğurt	Antihipertansif	Lim vd. (2011)
Yoğurt	Antihipertansif Antitrombotik Antimikrobiyal	Fitzgerald and Murray (2006)
Yoğurt	ACE-inhibisyon İmmünmodülatör	Meisel (2005)

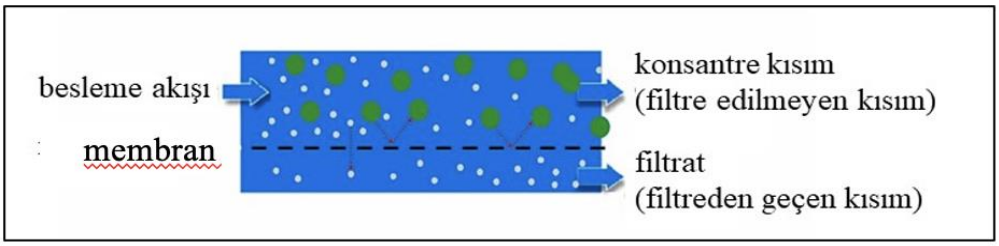
Tablo 2.2 Fermente süt ürünlerinin biyoaktiviteleri (Hafeez vd., 2014) (devamı)

Süt	Antihipertansif	FitzGerald vd. (2004)
Fermente süt (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LA2)	ACE-inhibisyon İmmünomodülatör	Regazzo vd. (2010)
Kefir	Antimikrobiyal	Chifiriuc vd. (2011)
Kefir	Antiinflamatuar	Lee vd. (2007)
Kefir	Antikanserojen Antimutajenik	Guzel-Seydim vd. (2006) Guzel-Seydim vd. (2011)

2.1.4 Biyoaktif Peptidlerin Fraksiyonlanması ve İdentifikasyonu

Gıda proteini hidrolizatları genellikle çok sayıda peptid dizisi ve serbest amino asit içerdiği için süt proteini hidrolizatlarına zenginleştirme ve/veya fraksiyonlama işlemleri sıklıkla uygulanmaktadır (Nongonierma & FitzGerald, 2018).

Membran filtrasyonu, birçok farklı endüstride biyomoleküllerin proses ölçeğinde ayrılması ve saflaştırılması için umut verici bir teknolojidir (Rajendran vd., 2021). Membran filtrasyonu, bir sıvı çözeltideki belirli bileşenlerin boyutlarına veya yük ve şekil gibi diğer özelliklerine göre yarı geçirgen bir membrandan seçici geçirgenliğine dayalı olarak çalışır. Ayırma işlemi için itici güçler basınç, elektriksel alanlar veya konsantrasyon olabilir. Basınç tahrikli membranlar genellikle biyolojik moleküllerin boyuta dayalı ayrıştırılması için kullanılmaktadır; membran gözenek boyutundan daha büyük bileşikler ve biyomoleküller geçemezken, daha küçük bileşikler membrandan geçmektedir (Şekil 2.5) (Alavi & Ciftci, 2023). Basınç tahrikli membran işlemleri mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), nanofiltrasyon (NF) ve ters osmoz (RO) işlemlerini kapsar. Bununla birlikte, biyoaktif peptid ayrımı için esas olarak UF ve NF teknolojileri kullanılmaktadır (Bazinet & Firdaous, 2009). Kullanılan membranın molekül ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) ve yük etkilerinin önemi göz önüne alındığında, basınç tahrikli membran teknolojisi, özellikle UF ve NF, BP'ler içeren protein hidrolizatlarını ayırmak için en etkili yöntemlerden biri haline gelmiştir. Daha da önemlisi, elde edilen peptidlerin biyolojik ve işlevsel özellikleri, uygun MWCO'na sahip UF membranları veya NF membranları kullanılarak geliştirilebilir. UF teknolojisi, membran ve BP'ler arasındaki boyut ve hidrofobiklik farklılıklarına göre 1000-10000 Da MW'a sahip BP'leri ayırmak için kullanılabilirken, NF genellikle boyut dışlama ve elektrostatik etkileşime dayalı olarak küçük peptidlerin (200-1000 Da MW) konsantrasyonu, geri kazanımı ve tuzdan arındırılması için kullanılır. UF ve NF'nin düşük maliyetli, enerji verimliliği yüksek, ölçek büyütmesi ve küçültmesi kolaydır. Basınç tahrikli membran prosesinin ayırma performansı, başlangıçtaki protein hidrolizat özelliklerinin (iyonik güç ve pH) yanı sıra BP'lerin özelliklerine (MW, konsantrasyon, yük ve hidrofobiklik), membran malzeme özelliklerine (yük, MWCO ve hidrofobiklik) ve hidrodinamik koşullara (çapraz akış hızı ve transmembran basıncı) bağlıdır (Liang vd., 2023).



Şekil 2.5 Basınçla çalışan membran prosesinin şematik gösterimi (Alavi & Ciftci, 2023)

Yüksek sertliği ve iyi termal stabilitesi nedeniyle polietersülfon (PES) polimeri UF membran malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılırken, rejenere selüloz, poliakrilonitril, selüloz asetat gibi diğer UF membran malzemeleri de proteinlerin ve peptidlerin izolasyonu için kullanılmaktadır. Tablo 2.2'de BP'lerin özelliklerinin belirlenmesinde basınç tahrikli membran teknolojisi kullanılan çalışmalar özetlenmiştir.

Peptidlerin ayrılması ve saflaştırılmasında kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bazı durumlarda membran filtrasyon ve kromatografik yöntemler veya birden fazla kromatografik yöntem birlikte kullanılabilir. Ters fazlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), affinite kromatografisi, iyon değişimi kromatografi, boyut dışlama kromatografisi, hidrofilik etkileşimler sıvı kromatografisi (HILIC), ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC), elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (ESI-MS) ve izoelektrik odaklama gibi tekniklerle peptidlerin saflaştırılması için kullanılan kromatografik yöntemlerdendir (Sosalagere vd., 2022). Peptid dizilerinin tanımlanmasında ise Edman degradasyonu ve çeşitli kütle spektrometresi yöntemleri kullanılır. Kütle spektrometresi yöntemleri peptid tanımlaması için etkili yöntemlerdir. Gelişmiş elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) ve matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) teknolojilerine dayanan kütle spektrometrisi (MS) yöntemleri peptidin sağlam bir molekül olarak tanımlanmasına veya bir kitlesel parmak izi ile tanımlanmasına olanak tanır (Öztürk & Oraç, 2024).

Tablo 2.3 BP'lerin özelliklerinin belirlenmesinde basınç tahrikli membran teknolojisi

Biyoaktif peptid kaynağı	MWCO	Biyoaktivite	Kaynak
Fermente süt	3, 5, 10 kDa	Antioksidan Antidiyabetik	Shirkhan vd. (2023)
Fermente keçi sütü	3 kDa	Antioksidan ACE-inhibitör	Moreno-Montoro vd. (2017)
Fermente deve sütü	3, 5, 10 kDa	Antioksidan ACE-inhibitör	Moslehishad vd. (2013)
Fermente süt	3, 5, 10 kDa	Antioksidan ACE-inhibitör	Moslehishad vd. (2013)
Fermente süt	3, 10 kDa	ACE-inhibitör	Wang vd. (2023)
Yoğurt serumu	5, 10 kDa	Antioksidan Antibakteriyel	Karimi vd. (2021)
Fermente koyun sütü	3, 10 kDa	Antioksidan Antibakteriyel	Ashokbhai vd. (2022)

MS analizinde moleküler ağırlığıyla ilişkili iyonlarını tespit ederek moleküler ağırlığını belirlenir ve analizin doğruluğunu arttırmak için için iki kütle analiz cihazının kullanıldığı Tandem MS veya MS/MS, peptid analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. MS/MS spektrumlarından peptidlerin tanımlanması, veri tabanı destekli yeni dizileme yoluyla gerçekleştirilir. Bu amaçla Peaks DB, MASCOT, BioConfirm, MaxQuant gibi çeşitli MS/MS veri işleme programları kullanılmaktadır. MALDI-TOF-MS'de numune ekstrakte edildikten sonra tüm peptidlerin kütlelerinin bir MS spektrumunu üretmek için analiz edilir. Analizden elde edilen MS verileri, peptidleri tanımlamak için cihaz kütüphanesindeki protein verileriyle karşılaştırılır. LC-MS/MS ile duyarlılığının/güvenilirliğinin daha yüksek olması ve karışık peptid içeriklerini daha iyi analiz edebilmesi nedeniyle peptid çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir (Öztürk & Oraç, 2024).

2.2 Biyoinformatik Yöntemler

Gıda matriksinde bulunan biyoaktif peptidlerin keşfedilmesini ve tanımlanmasını sağlayan *in vitro* yaklaşımlar zahmetli, zaman alıcı ve endüstriyel boyutta üretim için maliyetlidir (Saavedra vd., 2013). Klasik yaklaşımın bu zorluklarını aşmak için, bilgisayar tabanlı "*in silico*" olarak adlandırılan yöntem son zamanlarda gıda proteinlerinde şifrelenmiş biyoaktif peptidlerin keşfine yönelik olarak uygulanmaktadır. Birden fazla gıda proteinini ve proteolitik enzimi aynı anda değerlendirme avantajıyla biyoinformatik, biyoaktif peptid araştırmalarında dönüştürücü bir etki yaratmak için iyi bir konuma sahiptir. *In silico* yaklaşımı, gıda proteinlerinin birincil yapısındaki kriptik biyoaktif peptidlerin oluşum sıklığını belirlemek için BIOPEP gibi veri tabanlarında bulunan bilgilerin kullanılmasını içerir. Protein dizileri, başta evrensel protein bilgi bankası (UniProtKB) olmak üzere veri tabanlarından elde edilebilir (Udenigwe, 2014). Bu yaklaşımla, biyoaktif peptidlere ilişkin önemli bilgiler, laboratuvar sentezi yapılmadan önce gıda proteinlerinden hızlı ve etkili bir şekilde tahmin edilebilmektedir (Bersi vd., 2018).

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Materyaller, Mikroorganizmalar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan inek sütü yerel bir firmadan yağsız ve çiğ olarak temin edilmiş, soğuk zincirle laboratuvara getirilerek pastörize edilmiştir. Çalışmada kullanılan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları daha önce proje kapsamında izole edilen ve geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan izole edilmiştir. 5 adet *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ile 4 adet *S. thermophilus* suşu arasından, orto-fitaldialdehit (OPA) yöntemi ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi yapılarak proteolitik aktivitesi en yüksek olan bir adet *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşu ve bir adet *S. thermophilus* suşu seçilmiştir. Analizlerde kullanılan tüm kimyasallar çözeltiler analitik saflıktadır ve Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Kullanılacak Suşların Seçimi

3.2.1 Orto-fitaldialdehit (OPA) Metodu

OPA yöntemi, Church vd. (1983) tarafından belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları MRS besiyerinde, *S. thermophilus* M17 besiyerinde 42°C'de geliştirilmiş ve suşlar 10^7 kob/mL olacak şekilde yağsız süte inoküle edilmiştir. Mikroorganizmalar yağsız sütte 42 °C'de pH 4,6'ya düşene kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 5 mL örnek alınarak 1 mL distile su ve 10 mL 0,75N trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırılmıştır. Karışım vortekslenmiş ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra bu karışım filtre kağıdından süzülmüştür. Süzüntüden 50 µL analiz için ayrılmıştır. Orto-fitaldialdehit aktivitesinin ölçümü için, OPA çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltinin bileşenleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 OPA çözeltisi için kullanılan bileşenler

OPA çözeltisi bileşenleri
25 mL 100 mM sodyum tetraborat

Tablo 3.2 OPA çözeltisi için kullanılan bileşenler (devamı)

2,5 mL %20 (w/w) sodyum dodesil sülfat
40 mg OPA/1 mL metanol
100 µL β-merkaptoetanol

Tablo 3.1'de belirtilen kimyasallar karıştırıldıktan sonra distile su ile hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Daha önce ayrılan 50 µL örnek, 1 mL OPA reaktifi ile karıştırılmış ve 2 dakikalık inkübasyonun ardından karışımın absorbansı, UV-spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800 UV/VIS, Tokyo, Japonya) 340 nm'de okunmuştur.

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

Örneklerin SDS-PAGE analizi Laemmli (1970) tarafından belirtilen yönteme göre yapılmıştır. Örnekler saf suda konsantrasyonları 10 mg/mL olacak şekilde çözülmüştür. Örnekler tampon (0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), %4 (%10 v/v gliserol, %10 w/v SDS, %0,5 bromofenol mavisi, %10 v/v β-merkaptoetanol) ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılmış ve 5 dk boyunca 95 °C'de tutulmuştur. Elektroforez tankı, 25 mM Tris, %0,1 SDS, 192 mM glisinden oluşan elektrolit tamponu ile doldurulmuştur. Yükleme kuyusuna 20 µL örnek yüklenmiş ve dikey elektroforez sisteminde (Mini-PROTEAN®System, Bio-Rad, ABD) 20 mA sabit akımda çalıştırılmıştır. Yürütme işleminden sonra jel, %0,25 (w/v) Coomassie Brilliant Blue ile boyanmıştır. Boya giderme işleminde su/metanol/asetik asit (6/3/1, v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak (Biorad Gel Doc EZ, Bio-Rad Laboratories Inc, ABD) jelin fotoğrafı çekilmiştir

3.3 Biyoreaktörde Fermentasyon

3.3.1 Fermentasyon Koşulları

Fermentasyonda kullanılacak olan sütler 85 °C'de 30 dk pastörize edilmiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* MRS broth, *S. thermophilus* M17 broth besiyerinde geliştirilmiştir. Suşların inokülasyonundan önce sütün 42 °C'ye soğuması beklenmiştir. Biyoreaktörde (Minifors 2, Infors HT,

Bottmingen, İsviçre) 4 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.3 Biyoreaktörde kullanılan mikroorganizma kombinasyonları

Örnek kodu	**Mikroorganizma kombinasyonları**
B1	*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 18Y+ *S. thermophilus* 15Y
B2	*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 18Y + *S. thermophilus* 15Y + *L. rhamnosus* GG
B3	*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 18Y + *S. thermophilus* 15Y + *L. paracasei* BD101
B4	*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 18Y + *S. thermophilus* 15Y + *L. rhamnosus* GG + *L. paracasei* BD101

Mikroorganizmalar aseptik olarak %1 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Fermentasyonlar biyoreaktörde 42 °C'de, 150 rpm hızında karıştırma yapılarak gerçekleştirilmiştir. pH 4,6 'ya ulaştığında fermentasyonlar sonlandırılmıştır. Fermentasyon sırasında pH 6,4 ile 4,6 arasında, her 0,2 lik pH düşüşünde örnek alınmıştır. Bu örnekler protelizin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3.2 Proteolizin Belirlenmesi

Fermentasyon sırasında pH 6,4 ile pH 4,6 arasında, her 0,2 birimlik pH düşüşünde örnek alınmış olup, toplamda 10 örnek toplanmıştır. Bu örneklerin proteolizini belirlemek için başlık 3.2.1'de belirtilen OPA metodu kullanılmıştır.

3.3.3 Mikroorganizma Sayımı

Fermentasyon sırasında toplanan örneklerdeki mikroorganizmaların sayımı için fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Selektif sayım için farklı besiyerleri ve inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un sayımı için de Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar kullanılmıştır. İnkübasyon 42 °C'de 48 sa anaerobik olarak gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* için M17 agar kullanılmıştır. İnkübasyon 37 °C'de 24 sa ve aerobik olarak gerçekleştirilmiştir (Tharmaraj & Shah, 2003). *L. rhamnosus* GG için MRS-V agar (10 mg/L vankomisin içeren MRS agar) kullanılmıştır. İnkübasyon 43 °C'de 72 sa

anaerobik olarak gerçekleştirilmiştir. *L. paracasei* için MRS-V agar kullanılmıştır. İnkübasyon 37 °C'de 72 sa anaerobik olarak gerçekleştirilmiştir. *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei*'nin birlikte olduğu durumda, MRS-V agarda 43 °C'de 72 sa anaerobik koşullardaki toplam mikroorganizma sayısından, 37°C'de, 72 sa anaerobik koşullardaki mikroorganizma sayısı çıkarılarak *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* sayısı hesaplanmıştır (Sakai vd., 2010). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* suşlarının birlikte olduğu durumda, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sayısı, toplam sayıdan *L. rhamnosus* GG/ *L. paracasei* sayısının çıkarılmasıyla belirlenmiştir

3.4 Peptidlerin Hazırlanması

3.4.1 Peptidlerin Eldesi

Peptidlerin eldesinde Donkor vd. (2007) tarafından belirtilen metot kullanılmıştır. Fermentasyon pH 4,6'da sonlandırıldıktan sonra örnekler 12000 g'de, 4 ℃'de, 30 dk santrifüj edilmiştir (Himac CR22N, Hitachi, Tokyo, Japonya). Ardından süpernatantlar 0,45 μm filtreden geçirilmiştir ve liyofilize edilmiştir (Beta 1-8 LSCbasic, Martin Christ, Almanya).

3.4.2 Peptidlerin Fraksiyonlanması

Kurutulmuş olan peptidler steril distile suda tekrar çözündürülmüştür. Peptidlerin fraksiyonlanması amacıyla 5 ve 10 kilodalton (kDa) boyutlarındaki PES filtreler (Sartorius, Goettingen, Germany) kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon işlemi için yüksek basınçlı ve karıştırmalı mekanizma (Sterlitech HP4750, Washington, USA) kullanılmıştır. İşlem soğutmalı su sirkülatörü kullanılarak 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Homojeniteyi sağlamak ve filtre üzerinde birikmeyi önlemek için manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Sistem Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Fraksiyonlama işlemi bittikten sonra her bir örnek için ≤5 kDa, 5-10 kDa, ≥10 kDa ve fraksiyonlanmayan kısım olarak 4 örnek elde edilmiştir. Fraksiyonlanmayan kısım suda çözünen ekstrakt (SÇE) olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.1 Peptidlerin fraksiyonlanması

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

Başlık 3.2.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.5 Peptidlerin Analizleri

3.5.1 Protein Miktarının Belirlenmesi

Örneklerin protein miktarları Lowry metodu ile belirlenmiştir (Hartree, 1972). Bu analiz için 3 ayrı çözelti hazırlanmıştır.

1. çözelti için 2 g $KNaC_4H_4O_6$ ile 100 g Na_2CO_3 500 mL 1N NaOH içinde çözündürülmüş ve distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

2. çözelti için 2 g $KNaC_4H_4O_6$ ile 1 g $CuSO_4.5H_2O$ 90 mL distile suda çözündürülmüş ve 10 mL 1N NaOH ilave edilmiştir.

3. çözelti için Folin-Ciocalteu reaktifi su ile 15 kat seyreltilmiştir.

1. çözeltiden 0,9 mL alınarak, 1 mL örneğe ilave edilmiş ve karıştırılmış, 50 ℃'lik su banyosunda 10 dk bekletilmiştir, sonunda oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve 2. çözeltiden 0,1 mL ilave edilmiştir. Bu karışıma 3. çözeltiden 3 mL eklenmiş ve hızlıca karıştırılmıştır. Karışım 50 ℃'lik su banyosunda 10 dk bekletildikten sonra, oda sıcaklığında soğutulmuş ve 650 nm'de absorbansı belirlenmiştir. (OPTIZEN POP, KLAB, Daejeon, Güney Kore). Protein miktarının hesaplanması için bovin serum albumin ile 0,2-1 mg/mL arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

3.5.2 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.5.2.1 ABTS Radikal Süpürücü Aktivite

Örneklerin serbest radikal süpürme aktivitesini belirlemek için ABTS yöntemi kullanılmıştır (Vásquez-Villanueva vd., 2016). 2,45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM ABTS çözeltisi karanlıkta ve oda sıcaklığında 12-16 sa karıştırılarak ABTS+ radikali hazırlanmıştır. ABTS radikalini kullanmadan önce absorbansı 734 nm'de 0,700±0,002 olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı konsantarsyonlarda hazırlanan örneklerden 100 µL alınmış, 2 mL ABTS radikali ile karıştırılmıştır. Karışım 30 ℃'de, 10 dk, karanlıkta bekletilmiştir. Absorbans 734 nm'de spektrofotometre (Shimadzu UV-1800 UV/VIS, Tokyo, Japonya) ile ölçülmüştür. ABTS radikal süpürme aktivitesi denklem 3.1 ile hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})/A_{\text{kontrol}}] \times 100 \qquad (3.1)$$

Burada; $A_{kontrol}$, kontrol numunesinin absorbansı (distile su) ve $A_{örnek}$ ise örneğin absorbansıdır. Örneklerin ABTS radikal süpürücü aktivitesi IC50 (mg protein/mL) olarak ifade edilmiştir.

3.5.2.2 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

FRAP yöntemi, Benzie and Strain (1996) tarafından belirtilen metotta bazı değişiklikler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 3 adet çözelti hazırlanmıştır. 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ ve 10 mM TPTZ (40 mM HCl'de hazırlanmış) çözeltileri sırasıyla hacimce 10:1:1 olacak şekilde karıştırılmış ve FRAP reaktifi hazırlanmıştır. 100 µL örnek, 2 mL FRAP reaktifi ile karıştırılmış ve karışım 37 ℃'de 30 dk inkübe edilmiştir. Karışımın absorbansı 593 nm'de okunmuştur (Shimadzu UV-1800 UV/VIS, Tokyo, Japonya).

Kalibrasyon eğrisi Troloks (TE) kullanılarak hazırlanmış olup, sonuçlar mg TE/g protein eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.5.3 Antidiyabetik Aktivitenin Belirlenmesi

Örneklerin *in vitro* antidiyabetik aktiviteleri α-glukosidaz inhibisyonu ve α-amilaz inhibisyonu yöntemleri ile belirlenmiştir.

3.5.3.1 α-Glukosidaz İnhibisyon Aktivitesi

Örneklerin α-glukosidaz inhibisyon aktivitesinin belirlenmesinde Kumar vd. (2013) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Analizde kullanılacak olan α-glukosidaz pH'sı 6,9 olan ve 6,7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Hazırlanan α-glukozidaz (1 U/mL)'dan 100 µL alınarak 100 µL örnek ile karıştırılmıştır. Karışım 37 °C'de 10 dk su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışıma substrat olarak 75 µL, 3 mM para-nitrofenil α-D-glukopiranozid eklenmiş 37 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sodyum karbonat kullanılarak reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyonun absorbansı spektrofotometre (OPTIZEN POP, KLAB, Daejeon, G. Kore) ile 405 nm'de ölçülmüştür. İnhibisyon aktivitesini hesaplamak için denklem 3.2 kullanılmıştır. Sonuçlar IC50 mg protein/mL olarak verilmiştir. Akarboz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\%\ \alpha - \text{glukosidaz inhibisyonu} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})/A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.2)$$

Burada; $A_{kontrol}$, kontrol numunesinin absorbansı (distile su) ve $A_{örnek}$ ise örneğin absorbansıdır.

3.5.3.2 α-Amilaz İnhibisyon Aktivitesi

Örneklerin α-amilaz inhibisyon aktivitesinin belirlenmesinde Kumar vd. (2013) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Örnekten 50 µL alınmış ve 25 µL α-amilaz çözeltisi (1 U/mL) ile karıştırılmıştır. Karışım 5 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 20 mM fosfat tamponunda çözündürülmüş 100 µL %0,5 nişasta çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra %1 3,5-dinitrosalisilik asit ve %12 potasyum sodyum tartarat ile hazırlanan 100 µL DNS reaktifi ilave edilmiştir. Bu karışım 95 °C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışımın absorbansı spektrofotometre (OPTIZEN POP, KLAB, Daejeon, G. Kore) kullanılarak 540 nm'de ölçülmüştür. İnhibisyon aktivitesini hesaplamak için denklem 3.3

kullanılmıştır. Sonuçlar IC50 mg protein/mL olarak verilmiştir. Akarboz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\%\ \alpha - \text{amilaz inhibisyonu} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})/A_{\text{kontrol}}] \times 100 \qquad (3.3)$$

Burada; $A_{kontrol}$, kontrol numunesinin absorbansı (distile su) ve $A_{örnek}$ ise örneğin absorbansıdır.

3.5.4 ACE-inhibitör Aktivitenin Belirlenmesi

Örneklerin *in vitro* ACE-inhibisyon aktivitelerini belirlemek için Göksu vd. (2022) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Numunelerin *in vitro* ACE-inhibisyon aktiviteleri, sentetik bir florojenik peptidin açığa çıkmasına bağlı olarak belirlenmiştir. ACE inhibitör aktivitesi, ölçülen floresans ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Örnekler pH'sı 8,3 olan 0,1 M sodyum borat tamponunda hazırlanmıştır. 45 µL çözeltisi ve 25 µL 6,5 mM florojenik substrat (abz-sdk(dnp)p-oh trifloroasetat tuzu) karıştırıldı ve 37 °C, 1000 rpm'de çalkalanarak 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 20 µL ACE (25 mU mL^{-1}) eklenerek aynı şartlarda 1 sa inkübe edilmiştir. Reaksiyonda salınan floresan ürünler, floresansın λex 320 nm/λem 420 nm'de ölçülmesiyle izlenmiştir. Sonuçlar, 1 mg protein/mL için yüzde inhibisyon olarak ifade edilmiştir.

3.5.5 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Örneklerin antibakteriyel aktivitesi 96 kuyucuklu mikroplaka ile belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite için de Lima vd. (2018) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* Typhimurium patojenleri kullanılmıştır. Mikroorganizmalar nutrient broth kullanılarak 37 °C'de 18 sa aerobik olarak inkübe edilmiştir. Mikroorganizmalar kullanılmadan önce konsantrasyonları 10^5 kob/mL olarak ayarlanmıştır. Kuyucuklara 80 µL patojen, 120 µL örnek ilave edilmiştir. 96 kuyucuklu mikroplakalar 37 °C'de 24 sa süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbans ölçümü yapılmadan önce 30 sn boyunca çalkalama yapılarak homojenite sağlanmıştır. Ölçüm bir mikroplaka okuyucu (Epoch 2 Microplate Spektrofotometre, BioTek, Winooski, ABD) kullanılarak 595 nm'de gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak patojen içeren ve negatif kontrol olarak patojen içermeyen besiyerleri kullanılmıştır. Sonuçlar 1 mg protein/mL için bakteriyel gelişiminin yüzde inhibisyonu olarak verilmiştir.

3.5.6 Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Örneklerin sitotoksik aktivitesi Cakır-Koc vd. (2018) tarafından belirtilen yöntemin modifiye edilerek kullanılmasıyla belirlenmiştir. Analizde kullanılan hücre hattı Caco-2 adenokarsinom hücreleridir. Hücreler %10 fetal sığır serumu ve penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 ortamında, 37 °C'de %5 CO_2'de geliştirilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler, bir trypsinizasyon prosedürü kullanılarak çıkarılmış ve hücreler bir Thoma hücre sayma lamı ile sayılmıştır. Daha sonra, 96 kuyucuklu bir mikroplakaya kuyucuk başına 10^4 hücre eklenmiş ve hücrelerin kuyu diplerine tutunmasını sağlamak için 24 sa boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda örnekler eklenmiş ve karışım 24 sa boyunca 37 °C'de %5 CO_2'de içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklardan besi ortamı uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 uL 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT, 0,5 mg/mL) çözeltisi eklenmiştir. Mikroplakalar 37 °C'de 4 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, bir mikroplaka okuyucu (Epoch 2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, ABD) kullanılarak 450 nm'deki optik yoğunluğu belirlenmiştir. Besiyeri ortamı negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Canlı hücrelerin sayısını belirlemek için denklem 3.4 kullanılmıştır.

$$\%\ \text{hücre canlılığı} = (A_{örnek}/A_{\text{kontrol}}) \times 100 \qquad (3.4)$$

Burada; $A_{örnek}$, örneğin absorbansını, $A_{kontrol}$ besiyeri ortamının absorbansı ifade etmektedir.

3.6 İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS (Version 29, Armonk, NY, ABD) program kullanılarak analiz edildi. Değişkenler arasında fark olup olmadığı $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi kullanılarak belirlenmiştir.

4
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Suşların Seçimi

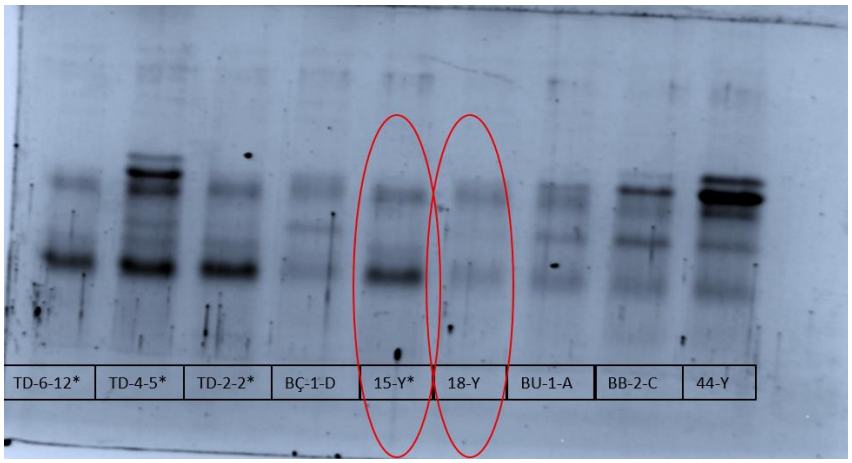
Çalışmada kullanılacak *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları daha önce geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan izole edilen suşlar arasından 5 adet *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile 4 adet *S. thermophilus* suşunun proteolitik aktivitesi ve SDS-Page analizine göre belirlenmiştir. Tablo 4.1'de suşların proteolitik aktivitesi verilmiştir.

Tablo 4.1 Suşların proteolitik aktiviteleri

L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus	**OD 340nm**	***S. thermophilus***	**OD 340nm**
18Y	0,51±0,02[a]	**15Y**	0,19±0,01[a]
BÇ-1-D	0,41±0,01[b]	**TD-6-12**	0,17±0,00[b]
BU-1-A	0,39±0,02[b]	**TD-2-2**	0,13±0,01[d]
BB-2-C	0,33±0,00[d]	**TD-4-5**	0,10±0,00[e]
44-Y	0,24±0,01[e]	-	-

[a-c] Aynı sutündaki farklı küçük üst simge harfler, örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

Şekil 4.1'de bu suşların SDS-Page bantları verilmiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşları arasında en çok parçalanmanın olduğu suş, en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan 18Y suşudur. *S. thermophilus* suşları arasında benzer bantlar gösteren 15Y ve TD-6-12 arasından daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu için 15Y seçilmiş ve çalışmada bu suşlar kullanılmıştır. Beklenildiği gibi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının proteolitik aktivitesi, *S. thermophilus* suşlarından daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.1 *L. delbrueckii* subps. *bulgaricus* ile *S. thermophilus* suşlarının SDS-page bantları (* ile işaretli olan suşlar *S. thermophilus* suşlarıdır.)

4.2 Fermentasyon, Mikroorganizma Sayım Sonuçları ve Proteoliz

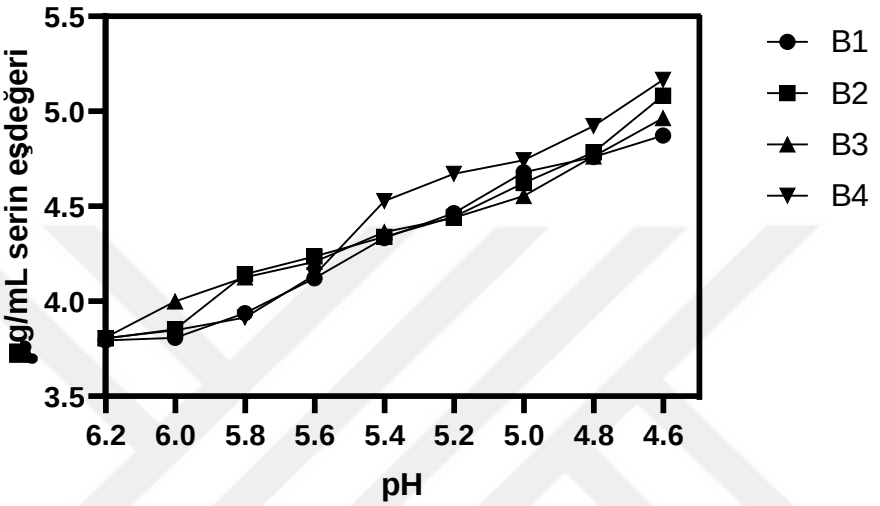
Fermentasyonlar pH 4,6'ya ulaştığında sonlandırılmıştır. Fermentasyonlar B1, B2, B3 ve B4 için sırasıyla 270 dakika, 210 dakika, 197 dakika ve 185 dakika sürmüştür. Şekil 4.2'de biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyon

B4, yani tüm mikroorganizmaların birlikte bulunduğu örnek pH 4,6'ya en hızlı ulaşan örnektir. Yoğurt üretiminde probiyotik bakteri ilavesinin fermentasyon süresini azalttığı daha önce belirtilmiştir (Zhou vd., 2019) tarafından çalışmada probiyotik ilavesi ile fermentasyon süresinin 75 dakika azaldığı belirtilmiştir.

LAB'lerin sahip olduğu hücre dışı bilar, fermentasyon esnasında süt proteinlerini parçalar ve serbest amino grupları açığa çıkar (Tavakoli vd., 2019). Bu serbest amino gruplarının miktarı OPA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, probiyotik kültürlerin ilavesinin fermente sütün proteolizinin artırdığını göstermiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi tüm mikroorganizmaları içeren örnekte yani B4'te pH 5,6'dan sonra proteolitik aktivite diğer örneklere göre hızla artmıştır.



Şekil 4.3 Örneklerin proteolizi

Önceki çalışmalar, süt fermentasyonunda yoğurt starterlerinin ve farklı probiyotik bakterinin birlikte kullanılmasıyla proteolitik aktivitenin sadece yoğurt starterleri kullanıldığı zamana göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Donkor vd., 2007; Gu vd., 2020; Sah vd., 2014). Tablo 4.1'de B1, B2, B3 ve B4'ün mikroorganizma sayım sonuçları verilmiştir. Starter kültürlerin ve probiyotik kültürler arasında olumsuz etkileşim olabileceği için bunların birlikte bulunduğundaki davranışları önemlidir. Probiyotiklerin canlılığı, çözünmüş oksijen, asitlik gibi faktörlerden olumsuz etkilenebilir (Rutella vd., 2016). Tablo 4.2'de görüldüğü gibi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un sayısının *S. thermophilus* ile birlikte olduğu durumla karşılaştırıldığında *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* varlığında istatistiksel olarak değişmediği görülmüştür ($p>0,05$). *S. thermophilus*'un sayısı *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un varlığında 8,01 log kob/g iken, diğer fermentasyonlarda (B2, B3 ve B4) sayısını azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). B2, B3 ve B4 fermentasyonlarının pH 4,6'ya ulaşması B1'den daha hızlı gerçekleşmiştir. Probiyotiklerin varlığında asitliğin hızlı bir şekilde artması *S. thermophilus* sayısında azalmaya neden olmuş

olabilir. *S. thermophilus*'un asitliğe duyarlığı olduğu ve pH 5,5'ten sonra gelişiminin kısıtlandığı bildirilmiştir (Ge vd., 2024). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un tüm fermentasyonlarda sayısını koruması asidik ortama iyi adaptasyonundan kaynaklanmış olabilir (Ge vd., 2024). Yoğurt üretiminde yer alan probiyotiklerin laktik asit ve organik asit üretiminde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Shori vd., 2022).

Tablo 4.2 pH 4,6'da örneklerin mikroorganizma sayıları ve fermentasyon süreleri

Mikroorganizma sayısı (log kob/g)	**Örnek kodu**			
	B1	**B2**	**B3**	**B4**
L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus	8,64±0,00^{a}	8,54±0,09^{a}	8,59±0,14^{a}	8,48±0,03^{a}
S. thermophilus	8,01±0,01^{a}	7,10±0,00^{c}	7,23±0,13^{c}	7,26±0,04^{b}
***L. rhamnosus* GG**	-	7,40±0,00^{a}	-	7,18±0,03^{b}
L. paracasei	-	-	7,37±0,03^{a}	7,23±0,04^{b}
Fermentasyon süresi (dk)	270±5,68^{a}	210±6,55^{b}	197±3,91^{c}	185±5,47^{d}

$^{a-d}$ Aynı satırdaki farklı küçük üst simge harfler, örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

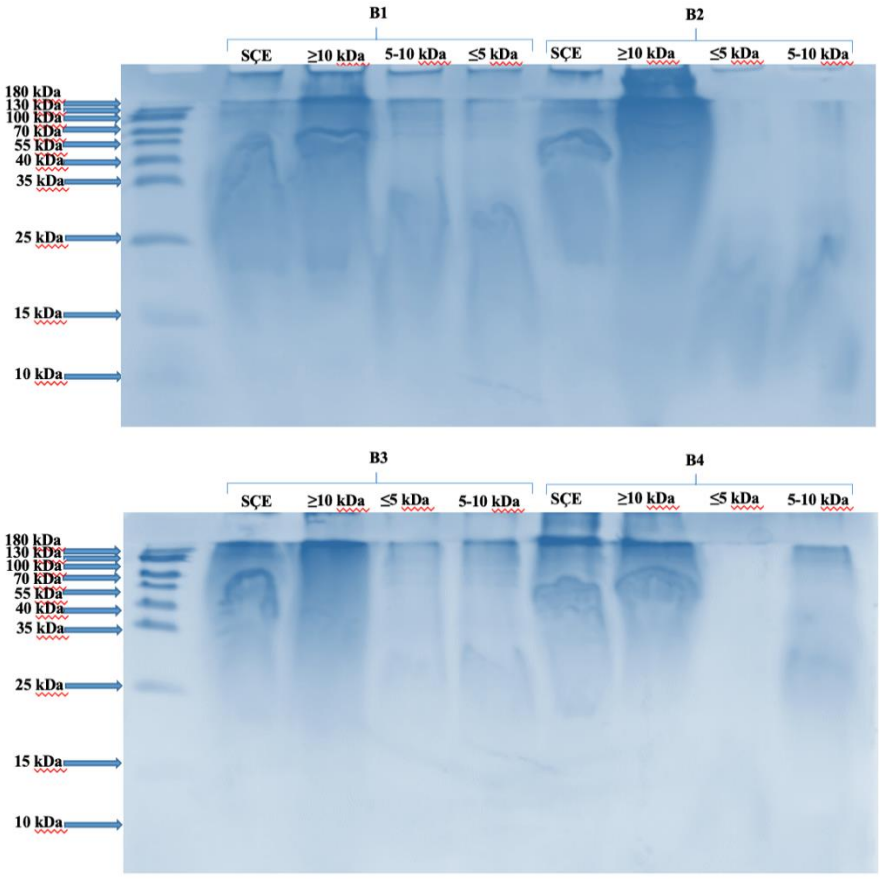
4.3 Peptidlerin Kurutulması, Fraksiyonlanması ve SDS-Page Analizi

Peptidler ekstrakte edildikten sonra liyofilize edilmiştir. Liyofilize örnek Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Liyofilize örnek

Fraksiyonlanan peptidlerin jel görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir. SÇE, 10 kDa ve 5 kDa boyutunda filtrelerden geçirildikten sonra elde edilen tüm numuneler jel üzerine yüklenmiştir. Şekilde görüldüğü gibi ≥10 kDa'lık numuneler büyük boyuttaki peptidlerin birikiminden dolayı daha belirgin bantlar vermiştir. ≤5 kDa peptid fraksiyonları düşük molekül ağırlığına sahip olduğu için belirgin bir bant vermemektedir. Jel görüntülerine göre numunelerde fraksiyonlanmanın meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 4.5 Örneklerin SDS görüntüleri

4.4 Örneklerin Protein Miktarı

Örneklerin protein miktarları Tablo 4.3'te verilmiştir. Analiz sonuçları hesaplanırken bu sonuçlara göre hesaplama yapılmıştır. Ayrıca, her bir fraksiyonun protein konsantrasyonu, proteolitik aktivitenin peptid parçalama seçiciliğindeki değişikliklerden kaynaklanabilecek şekilde, peptid fraksiyonlarının protein oranının önemli ölçüde farklılaştığını ortaya koymuştur. Proteolitik aktivite, süt fermantasyonu işlemi sırasında LAB hücre duvarı ilişkili proteinazların aktivitesine atfedilir; bu, büyük proteinlerin daha küçük peptidlere parçalanmasına yol açar. Böylece serbest amino asitler artmış olur (Shirkhan vd., 2023).

Tablo 4.3 Örneklerin protein miktarları

Fraksiyonlar	Protein miktarı mg/mL			
	B1	**B2**	**B3**	**B4**
SÇE	$1,04\pm0,02^{Bb}$	$1,02\pm0,06^{Bb}$	$1,24\pm0,04^{Ba}$	$1,06\pm0,02^{Bb}$
≥10 kDa	$1,83\pm0,03^{Ab}$	$1,98\pm0,05^{Aa}$	$1,49\pm0,10^{Ac}$	$1,34\pm0,06^{Ad}$
5-10 kDa	$0,90\pm0,04^{Cc}$	$0,70\pm0,00^{Cd}$	$0,97\pm0,04^{Cb}$	$1,04\pm0,02^{Ba}$
≤5 kDa	$0,80\pm0,03^{Db}$	$0,67\pm0,04^{Cc}$	$0,93\pm0,05^{Ca}$	$0,85\pm0,02^{Cb}$

$^{A-D}$ Aynı sütundaki farklı büyük üst simgeler, aynı örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

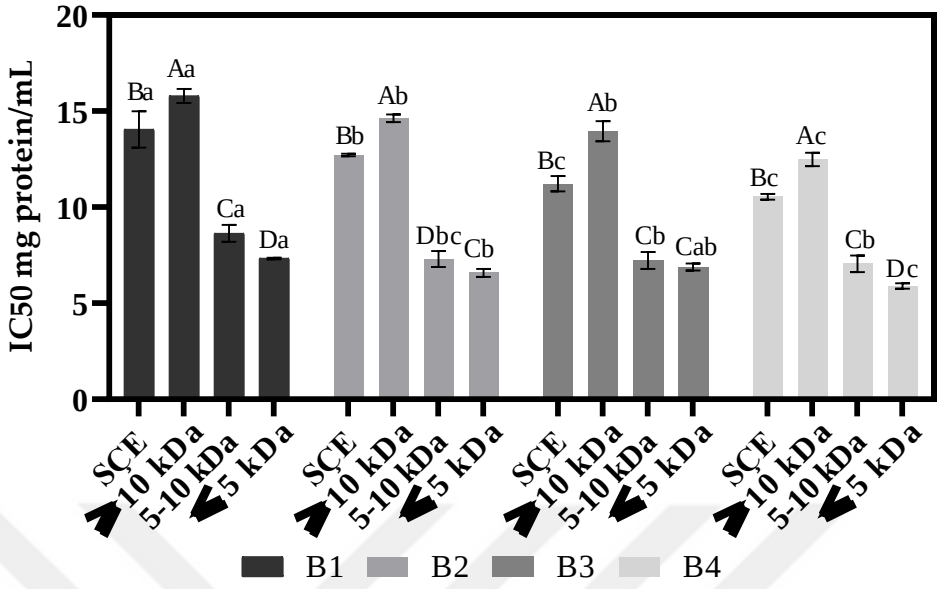
$^{a-d}$ Aynı satırdaki farklı küçük üst simgeler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

4.5 Antioksidan Aktivite

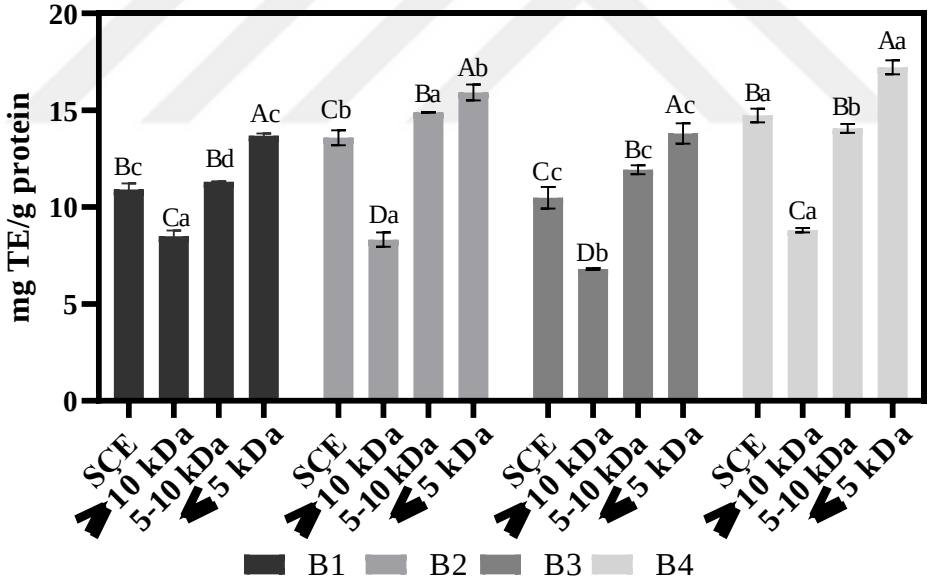
Örneklerin antioksidan aktivitesi ABTS ve FRAP yöntemleriyle belirlenmiştir. Sonuçlar sırasıyla Şekil 4.6A ve 4.6B'de sunulmuştur. ABTS sonuçları IC50 mg protein/mL olarak, FRAP sonuçları mg TE/mL olarak hesaplanmıştır. ABTS ve FRAP değerleri B1, B2, B3 ve B4 örnekleri için sırasıyla 14,05, 11,22, 12,69, 10,51 mg protein/mL ve 10,91, 13,58, 10,48 ve 14,73 mg TE/g protein olarak belirlenmiştir. Probiyotik içeren örnekler, probiyotik içermeyen örneklerle karşılaştırıldığında antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür ($p<0,05$). Sah vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurt starterleri ve probiyotiklerle üretilen yoğurtlardaki peptidlerin IC50 değerleri DPPH ve ABTS ile belirlenmiştir. DPPH ve ABTS yöntemleri için IC50 değerlerinin sırasıyla 1,52-2,23 mg/mL ve 1,63-2,42 mg/mL olduğunu bulmuşlardır. Genel olarak probiyotiklerle üretilen yoğurtların antioksidan aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir. Yazarlar aynı çalışmada yoğurttan elde ettikleri peptid ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri üzerine probiyotiklerin etkisini araştırmışlardır. Farklı probiyotikler içeren sekiz farklı yoğurt hazırlamışlar ve en düşük antioksidan aktivitenin *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* içeren yoğurtta en yüksek antioksidan aktivitenin ise yoğurt starterleri ile birlikte 3 farklı probiyotik (*L. acidophilus, L. casei, L. paracasei*) içeren yoğurtta olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada manda sütü *L. acidophilus* ve *L. helveticus* ile fermente edilmiştir ve

antioksidan aktivitesi ABTS yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. En yüksek antioksidan aktivitenin *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, S. thermophilus* ve *L. helveticus* içeren yoğurtlarda olduğu tespit edilmiştir (Taha vd., 2017). Bir başka çalışmada yoğurt üretiminde yoğurt starterlerine ek olarak *L. fermentum* ve *Lactiplantibacillus plantarum* suşları ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu şekilde üretilen yoğurtların radikal süpürme kapasitesinin sadece yoğurt starterleri ile üretilen yoğurtlardan daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Madhu vd., 2012). Yapılan çalışmaların sonuçları kullanılan probiyotik bakteriye ve birlikte kullanılan suşlara göre değişiklik göstermektedir (Moslehishad vd., 2013). Sütün fermentasyonu sırasında antioksidan aktivitenin gelişmesinin suşa bağlı bir faktör olduğunu belirtmiştir. Bu durum LAB'lerin kendi proteolitik enzimlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır. Aynı substrat için peptidlerin antioksidan kapasitesi, spesifik proteazlar spesifik peptid bağlarının hidrolizinde rol oynadığından LAB'deki enzim türüne bağlıdır (Kariyawasam vd., 2021). Probiyotiklerin metal şelatlama yeteneği, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim sistemlerine sahip olmaları, antioksidan aktiviteye sahip çeşitli metabolitler üretebilmeleri (Wang, Wu, vd., 2017) probiyotik bakteri kullanılan ürünlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasının nedenini açıklayabilir. Ayrıca probiyotiklerin ekzopolisakkarit üretimi de anitoksidan aktiviteye katkıda bulunmaktadır (Tiwari vd., 2021).

A)



B)



Şekil 4.6 Örneklerin antioksidan aktivitesi, A) ABTS, IC50 değeri (mg protein/mL), B) FRAP, mg TE/g protein

[A-D] Farklı büyük üst simge harfler, örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

[a-d] Farklı küçük üst simge harfler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

Diğer taraftan örneklerin antioksidan aktivitesi peptid fraksiyonlarına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Peptidlerin boyuta göre fraksiyonlanmasının antioksidan aktivitede farklılıklara neden olduğu ve küçük boyutulu peptidler antioksidan aktivitenin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Moreno-Montoro vd., 2017). Shirkhan vd. (2023), analiz ettikleri tüm fermente süt numunelerinde 3 kDa fraksiyonundaki antioksidan aktivitenin >10 kDa fraksiyonuna göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da düşük molekül ağırlıklı peptidlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. B4 numunesinin ≤5 kDa kısmı en düşük IC50 değerine (5,93 mg protein/mL) ve en yüksek FRAP değerine (17,21 mg TE/g protein) sahiptir. Protein hidrolizatlarının biyoaktiviteleri boyut, yapı ve amino asit dizisi gibi birçok parametreye bağlıdır. Farklı proteazlar farklı peptid bağlarını hidrolize ettiğinden antioksidan aktivitenin kullanılan LAB'lerin enzimine bağlı olarak değişeceği ifade edilmiştir (Sah vd., 2014).

4.6 Antidiyabetik Aktivite

Örneklerin antidiyabetik aktivite sonuçları α-glukosidaz ve α-amilaz inhibisyon yöntemleriyle belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir. α-glikosidaz ve α-amilaz için akarbozun IC50 değerleri sırasıyla 12,32 mg/ mL ve 18,93 mg/mL olarak hesaplanmıştır. α-glukosidaz ve α-amilaz analizlerinde tüm örneklerin IC50 değerlerinin akarbozun IC50 değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür. α-glukosidaz aktivitesi açısından tüm fraksiyonlarda en yüksek IC50 değeri B1 örneğine ait olduğu bulunmuştur. Yoğurt starterleriyle farklı probiyotiklerin birlikte kullanılması α-glukosidaz ve α-amilazın IC50 değerlerini önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,05$). Fraksiyonlanmamış örneklerinin IC50 değerleri B1, B2, B3 ve B4 için sırasıyla 44,28, 33,91, 33,00 ve 36,23 mg protein/mL olarak bulunmuştur. *L. rhamnosus* GG (33,91 mg protein/mL) ve *L. paracasei* (33,00 mg protein/mL) içeren örnek arasında fraksiyonlanmayan örnekler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. α-amilaz inhibisyon aktivitesinde en düşük IC50 değeri B3 (64,02 mg protein/mL) ve B4 (64,48 mg protein/mL) örneklerinin fraksiyonlanmamış kısım için bulunmuştur. Probiyotik süt ürünlerinin tüketilmesinden sonra kan şekerini düşürmesiyle ilgili farklı mekanizmalar önerilmiştir. Bunlardan biri α-glukosidaz ve α-amilaz enzimlerinin inhibisyonudur. Bu mekanizma, polisakkarit ve disakkarit hidrolizini

engelleyerek glikoz emilimi azaltılabilir ve bunun sonucunda kan şekeri düzeyi korunabilir. Bu inhibisyon, üründeki biyoaktif peptidlerin yanı sıra probiyotiklerin doğrudan aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Fermentasyon sırasında probiyotikler kazein ve serum proteinlerine etki ederek biyoaktif peptidlerin miktarını artırır. Bu peptidler, enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak enzim aktivitesini azaltabilir (Grom vd., 2020). Çok çeşitli probiyotikler ve probiyotik yoğurt, insülin direncini iyileştirmenin ve dolayısıyla antidiyabetik aktivite üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmanın yanı sıra sağlık açısından da farklı faydalara sahiptir. Bu konuyla ilgili hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar bu olguyu desteklemiştir (Gu vd., 2022). Ayyash vd. (2018), farklı probiyotikler tarafından fermente edilmiş deve ve sığır sütünün, α-amilaz ve α-glukosidaz aktivitelerinde farklı inhibisyonlar sergilediğini göstermiştir. Mevcut suşlar, hem α-amilaz hem de α-glukosidaz enziminin genel inhibisyonunun nedeni olabilecek küçük biyoaktif peptidler oluşturan proteolitik enzimleri üretebildiği belirtilmiştir (Ayyash vd., 2018). Ayrıca α-amilaz ve α-glukosidaz enzimlerinin farklı suşların aktivitesi ile serum proteinlerinden türetilen peptidler tarafından inhibe edilebileceği belirtilmiştir (Shirkhan vd., 2023). Ramchandran and Shah (2008), rekonstitüe yağsız sütteki yoğurt starterlerini ve farklı probiyotiklerin (*L. casei, L. acidophilus, B. longum*) α-glukosidaz inhibisyon aktivitesini araştırmışlardır. Yoğurt starterlerinin ve probiyotiklerin bazı potansiyel antidiyabetik etkilere sahip gibi olabileceğini belirtmişlerdir. Probiyotik fermente peynir altı suyu içecekleri için de benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Rosa vd., 2023).

Tablo 4.4 Örneklerin α-glukosidaz inhibisyon aktivitesi (IC50 mg protein/mL)

Fraksiyonlar	**α-glukosidaz inhibisyon aktivitesi (mg protein/mL)**				**Akarboz (mg/mL)**
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	
SÇE	44,28±0,55^{Ba}	33,91±1,07^{Bb}	33,00±0,34^{Bc}	36,23±0,09^{Bb}	12,32±0,08
≥10 kDa	57,24±1,09^{Aa}	45,53±0,17^{Ad}	50,13±0,29^{Ac}	52,17±0,25^{Ab}	
5-10 kDa	39,26±0,44^{Ca}	31,98±0,08^{Cb}	30,58±0,29^{Cc}	31,82±0,31^{Cb}	
≤5 kDa	34,69±0,08^{Da}	29,13±0,54^{Db}	28,43±0,61^{Db}	28,94±0,49^{Db}	

$^{A-D}$ Aynı sütundaki farklı büyük üst simgeler, aynı örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

$^{a-d}$ Aynı satırdaki farklı küçük üst simgeler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

Tablo 4.5 Örneklerin α-amilaz inhibisyon aktivitesi (IC50 mg protein/mL)

Fraksiyonlar	α-amilaz inhibisyon aktivitesi (mg protein/mL)				Akarboz (mg/mL)
	B1	B2	B3	B4	
SÇE	61,00±1,20^{Bb}	67,96±0,62^{Aa}	64,02±1,82^{Bb}	64,48±1,12^{Aab}	18,93±0,48
≥10 kDa	82,06±1,33^{Aa}	60,50±1,46^{Bc}	75,34±1,18^{Ab}	57,05±0,53^{Bd}	
5-10 kDa	36,54±3,67^{Cb}	44,29±0,32^{Ca}	41,75±0,67^{Cab}	42,57±1,36^{Ca}	
≤5 kDa	34,93±1,20^{Cb}	32,57±0,04^{Dc}	38,67±0,59^{Ca}	34,67±0,14^{Db}	

$^{A-D}$ Aynı sütundaki farklı büyük üst simgeler, aynı örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

$^{a-d}$ Aynı satırdaki farklı küçük üst simgeler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

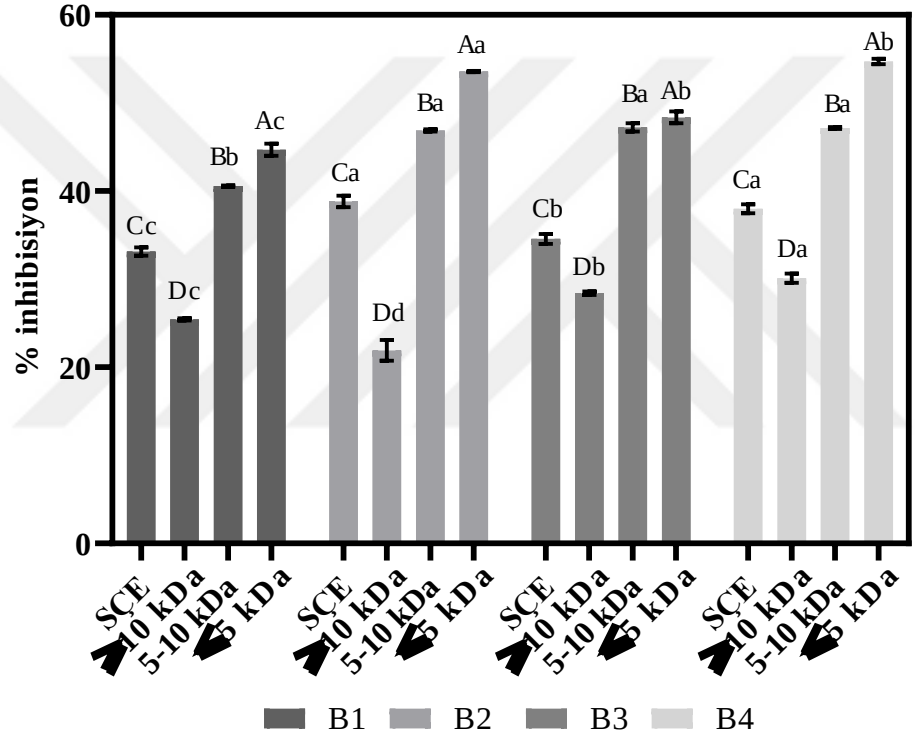
Molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlanan örneklerde α-glikosidaz ve α-amilaz aktiviteleri anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Genel olarak en düşük IC50 değerleri α-glikosidaz ve α-amilaz aktiviteleri ≤5 kDa fraksiyonundaki peptidlerde tespit edilmiştir. Bunu 5-10 kDa takip etmiştir. α-glikosidaz için B2, B3 ve B4 örneklerinin IC50 değerleri ≤5 kDa fraksiyonunda istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmazken, B1 örneğinin IC50 değeri daha yüksek bulunmuştur. α-amilaz için en düşük IC50 değeri, *L. rhamnosus* GG içeren B2 numunesinin ≤5 kDa fraksiyonunda bulunmuştur. Kinariwala vd. (2020) farklı *Lactobacillus* cinslerinin antidiyabetik aktivitesini araştırmışlardır. *Lactobacillus* cinslerinin arasında en yüksek α-amilaz aktivitesinin *L. rhamnosus* için bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca α-amilaz aktivitesinin kullanılan suşa bağlı olarak farklılık gösterdiği de belirtilmiştir.

Bazı çalışmalarda peptid fraksiyonları için de benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Shirkhan vd. (2023) sütü farklı LAB'lerle fermente etmiş ve 3, 5 ve 10 kDa membran filtreleri kullanarak peptidleri fraksiyonlamışlardır. Yüksek molekül ağırlıklı peptidler için düşük inhibisyon aktivitesi, düşük molekül ağırlıklı peptidler için yüksek antidiyabetik aktivite tespit etmişlerdir. Ayrıca ultrafiltrasyona tabii tutulmuş fermente sütlerde en yüksek antidiyabetik aktivite >10 kDa fraksiyonunda değil <3 kDa fraksiyonunda bulunmuştur.

4.7 ACE-inhibitör Aktivite

Örneklerin ACE-inhibitör aktivite değerleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Fraksiyonlanmamış kısım için ACE-inhibisyon değerleri B1, B1, B2, B3 ve B4 için sırasıyla %33,13, %38,83, %34,57 ve %38,00 olarak bulunmuştur. En düşük inhibisyon B1'e ait iken, B2 ve B4 değerleri en yüksek olup istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0,05$). Hem B2 hem de B4, *L. rhamnosus* GG suşunu içermektedir. *L. rhamnosus*'un proteolitik sisteminin prolin spesifik aminopeptidaz gibi spesifik peptidaz içerdiği ve bu enzimin de fermente sütte ACE inhibitorlerinin birikmesi sağladığı belirtilmiştir (Moslehishad vd., 2013).Yoğurt ve peptidleri, kan basıncını düşürme üzerindeki etkileri nedeniyle geniş çapta araştırılmıştır (Shakerian vd., 2015). Donkor vd. (2007), probiyotik yoğurttan α, β ve κ-kazein kaynaklı Ala-Arg-His-Pro-His Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu, Ile-Pro-Pro, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu, Arg-Ile-Asn-Lys'dir. –Lys, Ser–Leu–Pro–Gln–Asn, Val–Pro–Pro ve Ala–Arg–His–Pro–His dizilimlerine sahip ACE-inhibitör aktivitesine bulunan peptidleri izole etmişlerdir. Birçok çalışma, starter kültürler ve probiyotikler içeren yoğurtların, yalnızca starter kültür içeren yoğurtlara göre daha yüksek ACE inhibitör etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Donkor vd., 2007; Moreno-Montoro vd., 2017; Shakerian vd., 2015). Donkor vd. (2007) probiyotik yoğurtların ACE inhibitör aktivitesinin IC50 değerlerinin kontrol yoğurtlara göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Shakerian vd. (2015), probiyotik yoğurt örneklerinin, yalnızca yoğurt starterleriyle üretilen örneklere göre daha yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, probiyotiklerin yoğurt kültürleriyle birlikte kullanılması ACE inhibisyon aktivitesini artırmıştır. Önceki çalışmalar, ACE inhibitör aktivitesinin, kullanılan suşa (Moreno-Montoro vd., 2017; Moslehishad vd., 2013) ve fermentasyon koşullarına (Moslehishad vd., 2013) bağlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, tüm örneklerde en yüksek ACE inhibisyonu düzeyi ≤5 kDa (B1, B2, B3 ve B4 için %44,70, %53,56, %48,36 ve %54,71) fraksiyonlarında tespit edildi. ≤5 kDa'dan sonra tüm örneklerde en yüksek ACE inhibisyon değeri 5-10 kDa fraksiyonlarında bulundu. Moslehishad vd. (2013), *L. rhamnosus* kullanarak deve ve sığır sütünü fermente etmiş ve 10, 5 ve 3 kDa boyutlarında ultrafiltrasyon membranları ile ayırmıştır. ACE inhibitör aktivitesi için <5 kDa peptid fraksiyonlarının en düşük IC50 değerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Bir başka çalışmada *L. paracasei* kullanılarak fermente

edilen süt, <3 kDa, 3-10 kDa ve >10 kDa olarak fraksiyonlanmıştır. En yüksek ACE inhibitör aktivitesi <3 kDa fraksiyonunda belirlenmiştir, bunu 3-10 kDa takip etmiştir, en düşük ise >10 kDa fraksiyonunda belirlenmiştir. Ayrıca fraksiyonlanmamış kısmın ACE inhibitor aktivitesinin >10 kDa fraksiyonundan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Wang vd., 2023). Bu sonuçlar, düşük molekül ağırlıklı peptidlerin daha güçlü ACE inhibitör aktivitesi sergilediğini ve bu küçük peptidlerin, membran ultrafiltrasyonunun büyük peptidleri uzaklaştırmasıyla zenginleştirilebileceğini gösterdi (Li vd., 2017). Bu çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 4.7 Örneklerin ACE-inhibitör aktivitesi

[A-D] Farklı büyük üst simge harfler, örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

[a-d] Farklı küçük üst simge harfler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

4.8 Antibakteriyel Aktivite

Örneklerin antibakteriyel aktivitesi 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir. İnokülasyon sırasında patojen bakterilerin konsantrasyonu 5 log kob/mL olarak, örneğin test edilen patojene karşı oranı 120

µL:80 µLolarak belirlenmiştir. Test edilen tüm örneklerde antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. Örneklerin *E. coli* ve *S. aureus'*a karşı inhibisyonu daha yüksek iken, *S.* Typhimurium'a karşı inhibisyonu daha düşük bulunmuştur. Fraksiyonlanmayan kısımdaki örnekler arasında her üç bakteri üzerinde en yüksek antibakteriyel aktivite B4 örneğinde (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* + *S. thermophilus* + *L. rhamnosus* GG + *L. paracasei*) bulunmuştur ($p<0,05$). Antimikrobiyal peptidler, Gram-negatif bakterilerin dış zarlarına ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarına nüfuz ederek boşluklar oluşturarak hücre içeriğin dışarı çıkmasına neden olur (Karimi vd., 2021). Peptidlerin antibakteriyel aktivitesi ve seçiciliği; hidrofilik veya hidrofobikliğe, amfipatiklik ve peptid yükleri gibi bir dizi özelliğe bağlı olduğu belirtilmiştir (Sah vd., 2016). Literatürde fermente sütten elde edilen peptidlere ilişkin farklı antibakteriyel aktivite sonuçları bulunmaktadır. Taha vd. (2017) yoğurt starterleri, yoğurt starterleri ve *L. acidophilus* ile yoğurt starterleri ve *L. helveticus* içeren 3 farklı yoğurt üretmişler ve yoğurtlardan elde edilen biyoaktif peptidlerin *E. coli*, *S.* Typhimurium, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı farklı düzeylerde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Sah vd. (2016) yoğurttan elde ettikleri peptidlerin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada farklı probiyotikler ve yoğurt starterleri içeren yoğurdun *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Probiyotik içeren yoğurtların suda çözünebilen peptid ekstraktlarının, sadece yoğurt starterleri içeren ekstraktlara göre daha yüksek inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar probiyotik ilavesinin yoğurdun antibakteriyel özelliğini arttırdığını göstermektedir. Öte yandan antimikrobiyal peptidler dışında antibakteriyel aktivite çeşitli organik asitlerin üretiminden de kaynaklanabilmektedir (Heydari vd., 2023).

AMP'lerin aktivitesi elektrostatik yük, hidrofobiklik, hidrofiliklik gibi parametrelere bağlıdır. Katyonik AMP'ler, geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite ile bilinen, küçük, daha pozitif yüklü bir peptid sınıfıdır. Pozitif yüklere ek olarak, hidrofobik grupların hakim olduğu AMP'ler daha iyi antibakteriyel etkiler gösterebilir. Çünkü AMP'lerin hidrofobik kısmı, peptidi bakteriyel hücre zarına sabitleyebilir ve hücre zarının içine yerleştirebilir, zar yapısını tahrip ederek, hücre içi ve hücre dışı ozmotik basınca müdahale eder ve bakteri hücrelerinin ölümüne yol açabilir (Yan vd., 2021).

Sütün LAB suşları ile fermentasyonunun, düşük moleküler ağırlıklı biyoaktif peptidler üreterek süt proteinlerinin antibakteriyel aktivitesini artırma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Muhialdin & Algboory, 2018). Yapılan bir çalışmada yoğurt serumu farklı enzimlerle hidrolize edilerek fraksiyonlara ayrılmıştır. Hidrolize serumun *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve en yüksek inhibisyona sahip fraksiyonun 5-10 kDa arasında olduğu belirtilmiştir (Karimi vd., 2021). Başka bir çalışmada, fermente koyun sütü için *B. cereus*'a karşı maksimum inhibisyon 3 kDa fraksiyonunda, *S.* Typhimurium ve *Enterococcus faecalis*'e karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite ise 10 kDa filtratta elde edilmiştir (Ashokbhai vd., 2022). Bu çalışmada *E. coli'*ye karşı en yüksek inhibisyon aktivitesi tüm örneklerde ≤5 kDa fraksiyonunda elde edilmiştir (B4, B3, B2 ve B1 için sırasıyla %40,50, %38,67, %36,67 ve 34,53). *S. aureus* için en yüksek inhibisyon aktivitesi B4 örneğinde ≤5 kDa ve 5-10 kDa fraksiyonlarında, B2 örneğinde ise ≤5 kDa fraksiyonunda bulunmuş olup iki örnek arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). *S.* Typhimurium için en yüksek inhibisyon aktivitesi B4 numunesi için ≤5 kDa fraksiyonunda ve fraksiyonlanmayan örnekte bulunmuştur. Farklı molekül ağırlıklarına ve yüklere sahip peptidlerin varlığı, sinerjistik bir etki sağlayarak antimikrobiyal aktivitenin artmasına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (Kumar vd., 2016).

Tablo 4.6 Örneklerin antibakteriyel aktivitesi (% inhibisyon)

Suşlar	**Fraksiyonlar**	**Örnekler**			
		B1	**B2**	**B3**	**B4**
E. coli	**SÇE**	$29,26\pm0,59^{Cc}$	$32,43\pm0,14^{Cb}$	$27,26\pm0,11^{Cd}$	$34,77\pm0,19^{Ca}$
	≥10 kDa	$23,74\pm0,04^{Dc}$	$26,23\pm0,54^{Db}$	$20,75\pm0,43^{Dd}$	$28,18\pm0,65^{Da}$
	5-10 kDa	$31,60\pm0,58^{Bb}$	$35,08\pm0,51^{Ba}$	$32,04\pm1,20^{Bb}$	$37,39\pm0,37^{Ba}$
	≤5 kDa	$34,53\pm0,71^{Ab}$	$38,67\pm0,37^{Aa}$	$36,67\pm0,21^{Ab}$	$40,05\pm0,83^{Aa}$
S. aureus	**SÇE**	$21,25\pm0,75^{Bc}$	$25,24\pm0,42^{Db}$	$24,11\pm0,32^{Cb}$	$28,85\pm0,20^{Ba}$
	≥10 kDa	$22,75\pm0,40^{Bbc}$	$30,60\pm0,68^{Ca}$	$23,57\pm0,40^{Db}$	$21,70\pm0,84^{Cc}$
	5-10 kDa	$30,83\pm0,53^{Ad}$	$36,41\pm0,89^{Bb}$	$33,03\pm0,00^{Bc}$	$38,42\pm0,14^{Aa}$
	≤5 kDa	$32,21\pm0,97^{Ac}$	$38,48\pm0,50^{Aa}$	$35,91\pm0,18^{Ab}$	$38,24\pm0,26^{Aa}$

Tablo 4.7 Örneklerin antibakteriyel aktivitesi (% inhibisyon) (devamı)

S. Typhimurium	**SÇE**	19,09±1,01^{Bc}	24,58±0,38^{Bb}	23,15±0,42^{Ab}	27,30±0,41^{Aa}
	≥10 kDa	11,09±0,23^{Cc}	15,14±0,72^{Cb}	16,39±1,49^{Bb}	19,20±0,99^{Ca}
	5-10 kDa	17,65±1,30^{Bc}	27,83±1,22^{Aa}	21,51±1,02^{Ab}	25,52±0,92^{Ba}
	≤5 kDa	21,73±0,60^{Ac}	25,03±0,55^{ABb}	22,40±0,90^{Ac}	29,12±0,17^{Aa}

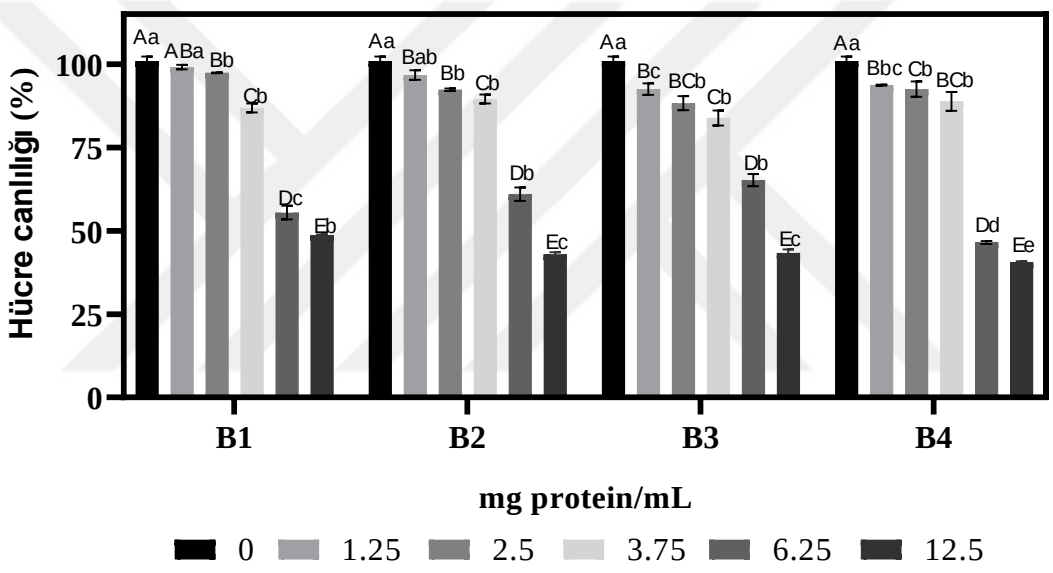
$^{A-D}$ Aynı sütundaki farklı büyük üst simgeler, aynı örneğin farklı moleküler boyutları arasındaki farklılıkları gösterir.

$^{a-d}$ Aynı satırdaki farklı küçük üst simgeler, farklı kültürler kullanılarak üretilen aynı moleküler boyuttaki örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

4.9 Sitotoksik Aktivite

Küçük molekül ağırlıklı peptidlerin büyük molekül ağırlıklı peptidlere göre daha iyi biyoaktif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Karami & Akbari-adergani, 2019). Bu çalışmada ≤5 kDa'lık peptidler analizde daha iyi sonuçlar verdiği için tüm örneklerde ≤5 kDa'lık peptidlerin sitotoksik etkisi tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda B1, B2, B3 ve B4 numunesi ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinin sonuçları Şekil 4.8'de ve en iyi sitotoksik etki B4 örneğinde tespit edildiği için bu örneğin mikroskobik görüntüleri Şekil 4.9'da 20x büyütmede gösterilmiştir. Mikroskobik görüntülerden tüm örneklerin hücreler üzerinde doza bağlı bir şekilde etki gösterdiği görülmektedir. Kontrol örneğinin konsantrasyonu ile B1 örneğinin en düşük konsantrasyonu (1,25 mg protein/mL) arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığındaki azalmanın düşük olduğu bulunmuştur. Hücre canlılıkları 1,25, 2,50 ve 3,75 mg protein/mL için sırasıyla %92,54-99,16, %88,33-97,44 ve %83,88-89,56 arasında değişmiştir. Probiyotik peynir altı suyu içeceklerinin düşük konsantrasyonlarının PC-3 prostat kanseri hücre hattına herhangi bir etkisinin olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Rosa vd., 2020). Sütten türetilen birçok peptidin antikanserojenik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Sah vd., 2015). En yüksek inhibisyon, tüm numuneler için en yüksek numune konsantrasyonunda (12,5 mg protein/mL) tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda B4, B2, B3 ve B1 için hücre canlılığı sırasıyla %40,56, %42,99, %43,27 ve %48,77 olarak belirlendi. Özellikle 6,25 ve 12,5 mg/mL konsantrasyonlarda probiyotik bakterilerle hücre inhibisyonu ilavesinde

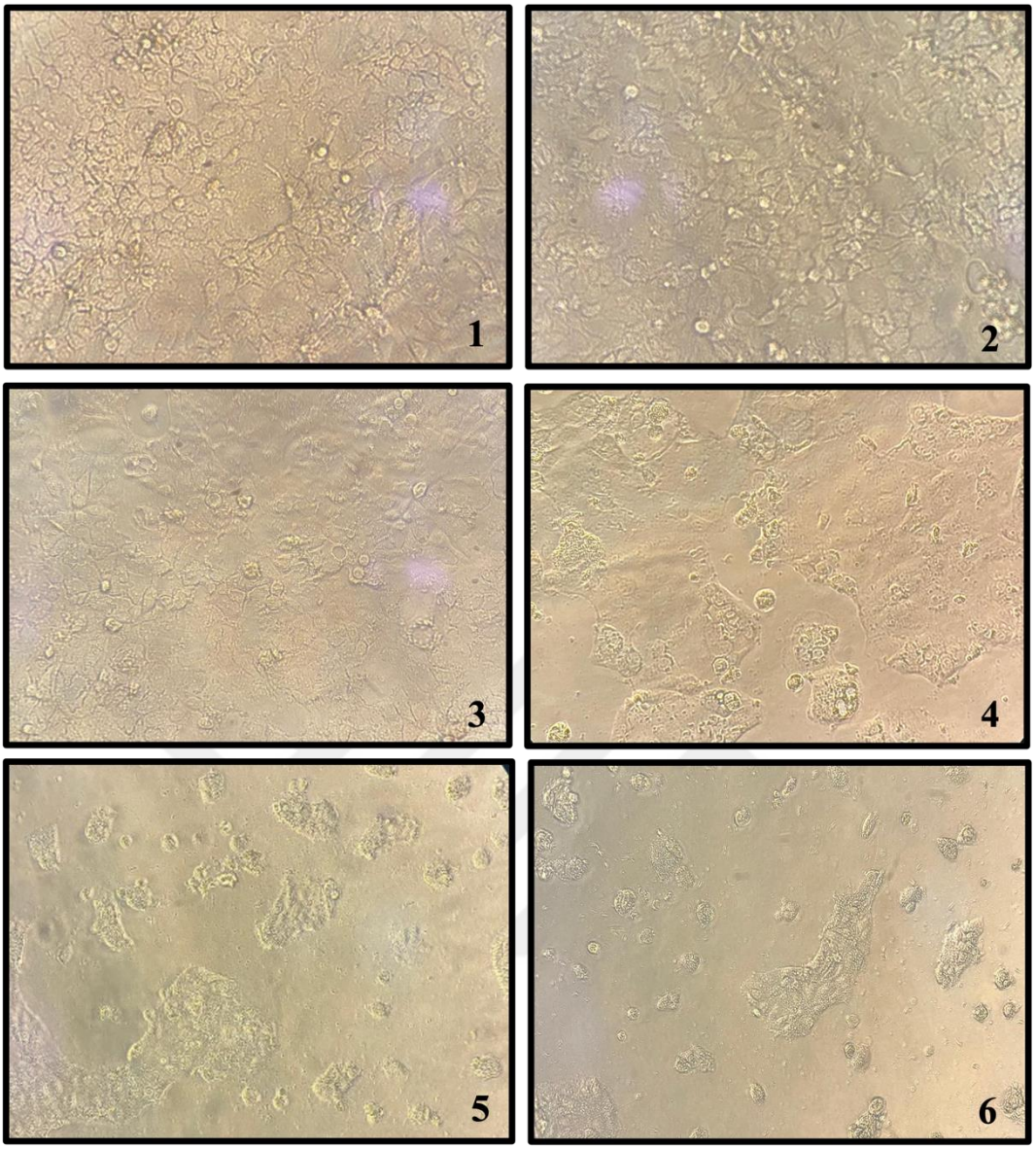
artış görülmektedir. HT 29 kolon kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkinin değerlendirildiği bir çalışmada, probiyotik ve yoğurt starterleri içeren yoğurtların antiproliferatif etkisinin (%40,52), sadece yoğurt starteri içeren yoğurda göre daha yüksek (%35,71) olduğu görülmüştür. Ayrıca en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilen 5 kDa'nın altındaki B4 örneğinin sonuçlarına paralel olarak en düşük hücre canlılığı B4 örneğinde bulunmuştur. Bu sonuç, probiyotik içeren yoğurttan izole edilen sığır β-kazein kaynaklı antioksidan aktiviteye sahip P17 (YQEPVLGPVRGPFPIIV) ve P19 (SLPQNIPPLTQTPVVVPPF) peptidlerinin HT 29 insan kolon kanserine karşı antiproliferatif aktiviteye sahip olmasıyla desteklenmektedir (Sah vd., 2016).



Şekil 4.8 Örneklerin ≤5 kDa fraksiyonlarının Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi (%)

[A-E] Aynı konsantrasyondaki farklı büyük üst simgeler, örnekler arasındaki farklılıkları gösterir.

[a-e] Aynı örnekteki farklı küçük üst simgeler, örneklerin konsantrasyonları arasındaki farklılıkları belirtir.



Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonda B4 numunesi ile muamele sonucunda Caco-2 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri

1) kontrol, 2) 1,25 mg protein/mL, 3) 2,5 mg protein/mL, 4) 3,75 mg protein/mL, 5) 6,25 mg protein/mL, 6) 12,5 mg protein/mL

5
SONUÇ

Biyoaktif peptidler son yıllarda farklı aktiviteleri nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiş ve peptidler üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Bu çalışmada *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları ile *L. rhamnosus* GG ve *L. paracasei* suşları birlikte ve ayrı ayrı kullanılarak süt fermente edilmiş, elde edilen peptidler ekstrakte edilmiş ardından fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonlanan bu peptidlerin biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Farklı probiyotik bakterilerle üretilen yoğurtların biyoaktif özellikleri üzerine çalışmalar olmasına rağmen her yoğurt türünün farklı proteolitik özelliklere sahip olması nedeniyle oluşan peptidlerin özellikleri farklılık göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde;

- *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları ile yapılan fermentasyon süresinin en uzun yani 270 dk sürdüğü, *L. rhamnos*us GG varlığında 210 dk, *L. paracasei* ile 197 ve tüm suşların birlikte bulunduğu durumda 185 dk sürdüğü belirlenmiş, böylece farklı probiyotik suşların ilavesi ile fermentasyon süresini kısaldığı belirlenmiştir.
- Probiyotik ilavesinin örneklerin analiz edilen özellikler üzerinde olumlu etkisinin olduğu, farklı probiyotik suşları birlikte kullanmanın antioksidan, antibakteriyel, ACE-inhibitör, antidiyabetik ve sitotoksik aktivite gibi biyoaktif özellikleri iyileştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca antioksidan aktivitenin yüksek proteolitik aktiviteyle ilişkili olduğu görülmüştür.
- Fermente ürünlerden biyoaktif peptid eldesi yapıldıktan sonra örnekler farklı boyutlardaki filtrelerden geçirilerek molekül ağrılıklarına göre ayrımı yapılmıştır. Yapılan analizlerde literatürde olduğu gibi düşük molekül ağırlıklı peptidlerin biyoaktif özellikleri daha iyi bulunmuştur. ≤5 kDa ve 5-10 kDa fraksiyonlarının peptidlerin biyoaktif özelliklerinin ≥10 kDa ve SÇE fraksiyonlarına göre daha yüksek antioksidan, antidiyabetik, ACE-inhibitör, antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuçlar probiyotik ilavesinin ve probiyotik çeşitliliğinin fermentasyon parametrelerini ve biyoaktif özellikleri önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir ($p<0.05$). Antioksidan, antidiyabetik, antibakteriyel, ACE-inihibitör ve sitotoksik

özellikler, güçlü proteolitik aktiviteye sahip farklı LAB'lerin kombinasyonları kullanılarak daha da geliştirilebilir. Farklı CEP'lere sahip olan suşların birlikte kullanılmasıyla proteinler farklı bölgelerinden parçalanarak spesifik biyoaktif özelliklere sahip peptidler oluşabilmektedir. İleri çalışmalarda biyoaktif özellik gösteren peptidler saflaştırılarak, bu özellikleri gösteren peptidlerin dizilerinin tespiti yapılabilir. Bu biyoaktif peptidlerin sindirimle aktivitelerinin değişimini tespit etmek için *in vitro* sindirim çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKÇA

Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Cardador-Martínez, A., Martín-del-Campo, S. T., & Amaya-Llano, S. L. (2021). Production of ACE inhibitory peptides from whey proteins modified by high intensity ultrasound using bromelain. *Foods, 10*(9). Retrieved from doi:10.3390/foods10092099

Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal, 66*, 91-98. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.006

Agyei, D., Potumarthi, R., & Danquah, M. K. (2013). Production of Lactobacilli proteinases for the manufacture of bioactive peptides: Part I—Upstream Processes *Marine Proteins and Peptides* (pp. 207-229).

Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive peptides: Synthesis, Sources, applications, and proposed mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(3). Retrieved from doi:10.3390/ijms23031445

Al-Ruwaih, N., Ahmed, J., Mulla, M. F., & Arfat, Y. A. (2019). High-pressure assisted enzymatic proteolysis of kidney beans protein isolates and characterization of hydrolysates by functional, structural, rheological and antioxidant properties. *LWT, 100*, 231-236. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.074

Alavi, F., & Ciftci, O. N. (2023). Purification and fractionation of bioactive peptides through membrane filtration: A critical and application review. *Trends in Food Science & Technology, 131*, 118-128. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.024

Ashokbhai, J. K., Basaiawmoit, B., Das, S., Sakure, A., Maurya, R., Bishnoi, M., . . . Hatia, S. (2022). Antioxidative, antimicrobial and anti-inflammatory activities and release of ultra-filtered antioxidative and antimicrobial peptides during fermentation of sheep milk: *In-vitro, in-silico* and molecular interaction studies. *Food Bioscience, 47*, 101666. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101666

Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S., & Liu, S.-Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α-amylase and α-glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry, 239*, 588-597. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.149

Bazinet, L., & Firdaous, L. (2009). Membrane Processes and devices for separation of bioactive peptides. *Recent Patents on Biotechnology, 3*(1), 61-72. doi:http://dx.doi.org/10.2174/187220809787172623

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*, *239*(1), 70-76. doi:https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Bersi, G., Barberis, S. E., Origone, A. L., & Adaro, M. O. (2018). Chapter 5 - Bioactive Peptides as Functional Food Ingredients. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Role of Materials Science in Food Bioengineering* (pp. 147-186): Academic Press.

Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M., & Corring, T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *5*(12), 578-584. doi:https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)90012-4

Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *26*(1), 139-150. doi:10.1007/s10989-019-09823-5

Boukil, A., Suwal, S., Chamberland, J., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated β-lactoglobulin. *Journal of Membrane Science*, *556*, 42-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.03.079

Caetano-Silva, M. E., Barros Mariutti, L. R., Bragagnolo, N., Bertoldo-Pacheco, M. T., & Netto, F. M. (2018). Whey Peptide–iron complexes increase the oxidative stability of oil-in-water emulsions in comparison to iron salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(8), 1981-1989. doi:10.1021/acs.jafc.7b04873

Caetano-Silva, M. E., Netto, F. M., Bertoldo-Pacheco, M. T., Alegría, A., & Cilla, A. (2021). Peptide-metal complexes: obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(9), 1470-1489. doi:10.1080/10408398.2020.1761770

Cakir-Koc, R., Budama-Kilinc, Y., Kaya, Z., Berber Orcen, B., & Ucarkus, E. (2018). Coconut oil-loaded chitosan nanoparticles for the treatment of acne vulgaris: cytotoxicity, antibacterial activity, and antibiofilm properties. *Fresenius Environmental Bulletin*, *27*(5), 2642-2648

Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-Derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, *10*(11). Retrieved from doi:10.3390/nu10111738

Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, *245*, 205-222. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087

Chauhan, V., & Kanwar, S. S. (2020). Chapter 4 - Bioactive peptides: Synthesis, functions and biotechnological applications. In M. L. Verma & A. K. Chandel (Eds.), *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 107-137): Elsevier.

Chen, Z., Li, Y., Lin, S., Wei, M., Du, F., & Ruan, G. (2014). Development of continuous microwave-assisted protein digestion with immobilized enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *445*(2), 491-496. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.025

Chifiriuc, M. C., Cioaca, A. B., & Lazar, V. (2011). *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe*, *17*(6), 433-435. doi:https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.020

Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, *65*(1), 1-12. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00725.x

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, *66*(6), 1219-1227. doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2

Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J., & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, *61*, 48-55. doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001

Costa, N. R., Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Pires, R. P. S., Moraes, J., Esmerino, E. A., . . . Cruz, A. G. (2018). Ohmic Heating: A potential technology for sweet whey processing. *Food Research International*, *106*, 771-779. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.046

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. doi:https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047

Cui, L., Yang, G., Lu, S., Zeng, X., He, J., Guo, Y., . . . Wu, Z. (2022). Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by *Lactobacillus* strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis. *Food Research International*, *156*, 111339. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111339

da Silva, R. R. (2017). Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, catalysis and potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*(1), 1-19. doi:10.1007/s12010-017-2427-2

Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, *964*, 116-127. doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025

Daliri, Lee, B. H., & Oh, D. H. (2018). Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(13), 2273-2284. doi:10.1080/10408398.2017.1319795

Daliri, Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods, 6*(5). Retrieved from doi:10.3390/foods6050032

de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International, 74*, 185-198. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.013

de Lima, M. d. S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silva, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., . . . Cavalcanti, M. T. H. (2018). Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10*(3), 446-455. doi:10.1007/s12602-017-9365-8

Dhaval, A., Yadav, N., & Purwar, S. (2016). Potential applications of food derived bioactive peptides in management of health. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 22*(3), 377-398. doi:10.1007/s10989-016-9514-z

Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal, 17*(11), 1321-1331. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.009

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition, 28*(5), 539-543. doi:https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013

El-Salam, M. H. A., & El-Shibiny, S. (2013). Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Reviews International, 29*(1), 1-23. doi:10.1080/87559129.2012.692137

Ferrazzano, G. F., Cantile, T., Quarto, M., Ingenito, A., Chianese, L., & Addeo, F. (2008). Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization- An *in vitro* study. *Australian Dental Journal, 53*(4), 314-319. doi:https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00072.x

Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology, 59*(2), 118-125. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition, 134*(4), 980S-988S. doi:https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S

Fountoulakis, M., & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A, 826*(2), 109-134. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00721-3

Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Zieliński, H., Wiczkowski, W., Zielińska, D., & Martínez-Villaluenga, C. (2016). High-pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increases angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64*(8), 1730-1740. doi:10.1021/acs.jafc.5b06080

Ge, Y., Yu, X., Zhao, X., Liu, C., Li, T., Mu, S., . . . Zhang, B. (2024). Fermentation characteristics and postacidification of yogurt by *Streptococcus thermophilus* CICC 6038 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CICC 6047 at optimal inoculum ratio. *Journal of Dairy Science, 107*(1), 123-140. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2023-23817

Giacometti, J., & Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry, 230*, 91-98. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.016

Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods, 6*, 384-394. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.005

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-i-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(9), 3898-3904. doi:10.1128/AEM.66.9.3898-3904.2000

Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42*(3), 223-239. doi:10.1080/10408690290825538

Gong, X., An, Q., Le, L., Geng, F., Jiang, L., Yan, J., . . . Wan, Y. (2022). Prospects of cereal protein-derived bioactive peptides: Sources, bioactivities diversity, and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62*(11), 2855-2871. doi:10.1080/10408398.2020.1860897

Göksu, A. G., Çakır, B., & Gülseren, İ. (2022). Industrial utilization of bioactive hazelnut peptide fractions in the manufacture of functional hazelnut paste: ACE-inhibition and allergy suppression. *Waste and Biomass Valorization, 13*(8), 3561-3572. doi:10.1007/s12649-022-01750-9

Grom, L. C., Coutinho, N. M., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., . . . Cruz, A. G. (2020). Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. *Trends in Food Science & Technology, 101*, 165-171. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.012

Gu, Y., Li, X., Chen, H., Sun, Y., Yang, L., Ma, Y., & Yong Chan, E. C. (2022). Antidiabetic effects of multi-species probiotic and its fermented milk in mice via restoring gut microbiota and intestinal barrier. *Food Bioscience, 47*, 101619. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101619

Gu, Y., Li, X., Liu, H., Li, Q., Xiao, R., Dudu, O. E., . . . Ma, Y. (2020). The impact of multiple-species starters on the peptide profiles of yoghurts. *International Dairy Journal, 106*, 104684. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104684

Guan, H., Diao, X., Jiang, F., Han, J., & Kong, B. (2018). The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chemistry, 245*, 89-96. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.081

Gunnarsson, P. T., Winzell, M. S. r., Deacon, C. F., Larsen, M. O., Jelic, K., Carr, R. D., & Ahrén, B. (2006). Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology, 147*(7), 3173-3180. doi:10.1210/en.2005-1442

Guo, P., Qi, Y., Zhu, C., & Wang, Q. (2015). Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds. *Journal of Functional Foods, 19*, 394-403. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.003

Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51*(3), 261-268. doi:10.1080/10408390903579029

Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & TaŞ, T. (2006). Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *International Journal of Dairy Technology, 59*(3), 209-215. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00265.x

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International, 63*, 71-80. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.002

Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A.-D., & Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(18), 3097-3129. doi:10.1080/10408398.2017.1352564

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, 18*(2), 163-169. doi:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013

Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry, 48*(2), 422-427. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2

Hegenauer, J., Saltman, P., & Ludwig, D. (1979). Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. 2. Comparison of metal complexes in heated and pasteurized milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*(4), 868-871. doi:10.1021/jf60224a049

Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1998). Distribution of Iron between caseins and whey proteins in acidified milk. *LWT - Food Science and Technology, 31*(7), 632-638. doi:https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0413

Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., & Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal, 38*(2), 82-100. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004

Heydari, S., Hosseini, S. E., Mortazavian, A. M., & Taheri, S. (2023). Extraction of bioactive peptides produced in probiotic yoghurt and determination of their biological activities. *International Dairy Journal, 139*, 105544. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105544

Higgins, J. J. (1998). "The kinetics of mild acid hydrolysis of gluten and the functional properties of the modified proteins at various levels of hydrolysis : a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology at Massey University," Doctor of Philosophy (Ph.D.) Doctoral, Massey University. [Online]. Available: http://hdl.handle.net/10179/3329

Hu, J., Xu, H., Shi, R., Gantumur, M.-A., Jiang, Z., & Hou, J. (2024). Emerging thermal modifying methods in milk protein: A review. *Trends in Food Science & Technology, 146*, 104407. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104407

Izquierdo, F. J., Peñas, E., Baeza, M. L., & Gomez, R. (2008). Effects of combined microwave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal, 18*(9), 918-922. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.01.005

Jabbari, S., Hasani, R., Kafilzadeh, F., & Janfeshan, S. (2012). Antimicrobial peptides from milk proteins: A prospectus. *Annals of Biological Research, 3*(11), 5313-5318.

Jayathilakan, K., Ahirwar, R., & Pandey, M. (2018). Bioactive compounds and milk peptides for human health-a review. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science, 1*(5), 116-122.

Juillard, V., Lopez-Kleine, L., & Monnet, V. (2022). Lactic Acid Bacteria: Proteolytic Systems. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 249-255). Oxford: Academic Press.

Kamau, S. M., Lu, R.-R., Chen, W., Liu, X.-M., Tian, F.-W., Shen, Y., & Gao, T. (2010). Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International, 26*(4), 386-401. doi:10.1080/87559129.2010.496025

Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology, 56*(2), 535-547. doi:10.1007/s13197-018-3549-4

Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S., & Eyvazzadeh, O. (2021). Isolation and purification of bioactive peptides from yogurt whey: Application as a natural preservative in a model food system. *Journal of Food Processing and Preservation, 45*(12), e16086. doi:https://doi.org/10.1111/jfpp.16086

Kinariwala, D., Panchal, G., Sakure, A., & Hati, S. (2020). Exploring the potentiality of *Lactobacillus* cultures on the production of milk-derived bioactive peptides with antidiabetic activity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 26*(3), 1613-1627. doi:10.1007/s10989-019-09958-5

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods, 1*(2), 177-187. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal, 16*(9), 945-960. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Kumar, Raghavendra, M., Tokas, J., & Singal, H. R. (2017). Chapter 24 - Milk Proteins: Precursors of Antioxidative Peptides and Their Health Benefits. In R. R. Watson, R. J. Collier, & V. R. Preedy (Eds.), *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan* (pp. 313-323): Academic Press.

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, 139*, 20-25. doi: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. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.007

Kunda, P. B., Benavente, F., Catalá-Clariana, S., Giménez, E., Barbosa, J., & Sanz-Nebot, V. (2012). Identification of bioactive peptides in a functional yogurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. *Journal of Chromatography A, 1229*, 121-128. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.093

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0

Lee, M.-Y., Ahn, K.-S., Kwon, O.-K., Kim, M.-J., Kim, M.-K., Lee, I.-Y., . . . Lee, H.-K. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology, 212*(8), 647-654. doi:https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.05.004

Li, C., Kwok, L.-Y., Mi, Z., Bala, J., Xue, J., Yang, J., . . . Chen, Y. (2017). Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science, 100*(12), 9495-9507. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2017-12970

Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A. O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality, 2017*(1), 2784146. doi:https://doi.org/10.1155/2017/2784146

Liang, T., Lu, H., Ma, J., Sun, L., & Wang, J. (2023). Progress on membrane technology for separating bioactive peptides. *Journal of Food Engineering, 340*, 111321. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111321

Lim, S.-M., Lee, N.-K., Park, K., Yoon, Y. C., & Paik, H.-d. (2011). ACE-inhibitory effect and physicochemical characteristics of yogurt beverage fortified with whey protein hydrolysates. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 31*, 886-892.

Lin, S., Jin, Y., Liu, M., Yang, Y., Zhang, M., Guo, Y., . . . Yin, Y. (2013). Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with

assisting of high-intensity pulsed electric field. *Food Chemistry, 139*(1), 300-306. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.048

Liu, C., Ren, D., Li, J., Fang, L., Wang, J., Liu, J., & Min, W. (2018). Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fisch) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods, 42*, 203-215. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.003

Liu, Y.-F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., & Silcock, P. (2018). Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(15), 2508-2530. doi:10.1080/10408398.2017.1329704

Madhu, A. N., Amrutha, N., & Prapulla, S. G. (2012). Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 4*(2), 90-97. doi:10.1007/s12602-012-9099-6

Maestri, E., Marmiroli, M., & Marmiroli, N. (2016). Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *Journal of Proteomics, 147*, 140-155. doi:https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.048

Mahgoub, S., Alagawany, M., Nader, M., Omar, S. M., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A., . . . Dhama, K. (2023). Recent development in bioactive peptides from plant and animal products and their impact on the human health. *Food Reviews International, 39*(1), 511-536. doi:10.1080/87559129.2021.1923027

Mahmoud, E.-S., & Sameh, A. (2019). Milk bioactive peptides: antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic activities. *Advances in Biochemistry, 7*(1), 22-33. doi:10.11648/j.ab.20190701.15

Manzoor, M., Singh, J., & Gani, A. (2022). Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *In vitro*, *in silico* and *in vivo* studies. *Food Chemistry, 373*, 131395. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131395

Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology, 80*, 187-198. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.013

Marcone, S., Belton, O., & Fitzgerald, D. J. (2017). Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology, 83*(1), 152-162. doi:https://doi.org/10.1111/bcp.13002

Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., . . . Aguilar-González, C. N. (2019). Chapter 14 - Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 221-246): Academic Press.

Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Frias, J. (2017). Chapter 2 - Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and Evidence for Health Effects. In J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, & E. Peñas (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 23-47). Boston: Academic Press.

Meisel, H. (2005). Biochemical Properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry, 12*(16), 1905-1919. doi:http://dx.doi.org/10.2174/0929867054546618

Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Arab, M., & Nematollahi, A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal, 109*, 104793. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104793

Mirzapour, M., Rezaei, K., & Sentandreu, M. A. (2017). Identification of potent ACE inhibitory peptides from wild almond proteins. *Journal of Food Science, 82*(10), 2421-2431. doi:https://doi.org/10.1111/1750-3841.13840

Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences, 23*(5), 577-583. doi:https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005

Mora, L., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2016). Bioactive Peptides in Foods. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 395-400). Oxford: Academic Press.

Mora, L., & Toldrá, F. (2023). Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. *Current Opinion in Food Science, 49*, 100973. doi:https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100973

Moreno-Montoro, M., Jauregi, P., Navarro-Alarcón, M., Olalla-Herrera, M., Giménez-Martínez, R., Amigo, L., & Miralles, B. (2018). Bioaccessible peptides released by in vitro gastrointestinal digestion of fermented goat milks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410*(15), 3597-3606. doi:10.1007/s00216-018-0983-0

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Rufián-Henares, J. Á., Martínez, R. G., Miralles, B., Bergillos, T., . . . Jauregi, P. (2017). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. *Food & Function, 8*(8), 2783-2791. doi:10.1039/C7FO00666G

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. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.015

Muhialdin, B. J., & Algboory, H. L. (2018). Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *PharmaNutrition, 6*(2), 69-73. doi:https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.02.002

Munir, M., Nadeem, M., Mahmood Qureshi, T., Gamlath, C. J., Martin, G. J. O., Hemar, Y., & Ashokkumar, M. (2020). Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrasonics Sonochemistry, 67*, 105140. doi:https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105140

Murtaza, M. A., Irfan, S., Hafiz, I., Ranjha, M. M. A. N., Rahaman, A., Murtaza, M. S., . . . Siddiqui, S. A. (2022). Conventional and novel technologies in the production of dairy bioactive peptides. *Frontiers in Nutrition, 9*. doi:10.3389/fnut.2022.780151

Mustățea, G., Ungureanu, E. L., & Iorga, E. (2019). Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: a short review.

Ngoh, Y.-Y., & Gan, C.-Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry, 190*, 331-337. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.120

Nishi, T., Hara, H., Asano, K., & Tomita, F. (2003). The soybean β-Conglycinin β 51–63 Fragment suppresses appetite by stimulating cholecystokinin release in rats. *The Journal of Nutrition, 133*(8), 2537-2542. doi:https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2537

Nishi, T., Hara, H., & Tomita, F. (2003). Soybean β-Conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *The Journal of Nutrition, 133*(2), 352-357. doi:https://doi.org/10.1093/jn/133.2.352

Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2018). Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410*(15), 3407-3423. doi:10.1007/s00216-017-0793-9

Öztürk, H. İ., & Akın, N. (2020). Gıda proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptidler: fonksiyonlari ve sağlık üzerinde oynadığı rollere göre sınıflandırılması. [Food proteins-derived bioactive peptides: functions and classification according to their roles on health]. *Gıda, 46*(1), 42-52. doi:10.15237/gida.GD20095

Öztürk, H. İ., & Oraç, A. (2024). Harvesting bioactive peptides from sustainable protein sources: Unveiling technological and functional properties through *in silico* analyses. *Food and Humanity, 2*, 100294. doi:https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100294

Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in milk and dairy products: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *35*(6), 831-840. doi: https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831

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. doi:https://doi.org/10.3945/an.114.007690

Patil, S. P., Goswami, A., Kalia, K., & Kate, A. S. (2020). Plant-derived bioactive peptides: A treatment to cure diabetes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 26*(2), 955-968. doi:10.1007/s10989-019-09899-z

Peighambardoust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive

peptides in food applications. *Biomolecules, 11*(5). Retrieved from doi:10.3390/biom11050631

Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Machado, L., Ferreira, S., Costa, J., Villa, C., . . . Vicente, A. A. (2021). Influence of ohmic heating on the structural and immunoreactive properties of soybean proteins. *LWT, 148*, 111710. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111710

Perreault, V., Hénaux, L., Bazinet, L., & Doyen, A. (2017). Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities. *Food Chemistry, 221*, 1805-1812. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.100

Petti, S., Tarsitani, G., & Simonetti D'Arca, A. (2008). Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci *in vitro*. *Archives of Oral Biology, 53*(10), 985-990. doi:https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.04.009

Piccolomini, A., 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 & Nutrition Research, 0*(0). doi:10.3402/fnr.v56i0.17549

Rajendran, S. R. C. K., Mason, B., & Doucette, A. A. (2021). Review of membrane separation models and technologies: processing complex food-based biomolecular fractions. *Food and Bioprocess Technology, 14*(3), 415-428. doi:10.1007/s11947-020-02559-x

Ramchandran, L., & Shah, N. P. (2008). Proteolytic profiles and angiotensin-i converting enzyme and α-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Science, 73*(2), M75-M81. doi:https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00643.x

Regazzo, D., Da Dalt, L., Lombardi, A., Andrighetto, C., Negro, A., & Gabai, G. (2010). Fermented milks from *Enterococcus faecalis* TH563 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Dairy Science & Technology, 90*(4), 469-476. doi:10.1051/dst/2010009

Rosa, L. S., Santos, M. L., Abreu, J. P., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, H. L. A., . . . Teodoro, A. J. (2020). Antiproliferative and apoptotic effects of probiotic whey dairy beverages in human prostate cell lines. *Food Research International, 137*, 109450. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109450

Rosa, L. S., Santos, M. L., Abreu, J. P., Rocha, R. S., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., . . . Teodoro, A. J. (2023). Probiotic fermented whey-milk beverages: Effect of different probiotic strains on the physicochemical characteristics, biological activity, and bioactive peptides. *Food Research International, 164*, 112396. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112396

Rutella, G. S., Tagliazucchi, D., & Solieri, L. (2016). Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiology, 60*, 54-61. doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.017

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. Retrieved from doi:10.3390/nu3090765

Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., & Ferranti, P. (2013). An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, *54*(1), 925-934. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.034

Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, *156*, 264-270. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105

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. doi: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. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.003

Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2018). Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(5), 726-740. doi:10.1080/10408398.2016.1217825

Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., . . . Kushiro, A. (2010). M-RTLV agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, *139*(3), 154-160. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.019

Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, *1*(1), 29-46. doi:10.1093/fqsafe/fyx006

Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(4), 394-406. doi:10.1007/s00253-006-0427-1

Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1262-1277. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014

Shakerian, M., Razavi, S. H., Ziai, S. A., Khodaiyan, F., Yarmand, M. S., & Moayedi, A. (2015). Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by different levels of fat, inulin and starter culture. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(4), 2428-2433. doi:10.1007/s13197-013-1202-9

Shirkhan, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Akbari-adergani, B., & Nasoohi, N. (2023). The role of lactic acid bacteria in production of bioactive peptides in fermented milk with antioxidant and antidiabetic properties. *Journal of*

Food Measurement and Characterization, 17(5), 4727-4738. doi:10.1007/s11694-023-01968-8

Shori, A. B., Albalawi, A., Al Zahrani, A. J., Al-sulbi, O. S., & Baba, A. S. (2022). Microbial analysis, antioxidant activity, and sensory properties of yoghurt with different starter cultures during storage. *International Dairy Journal, 126*, 105267. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105267

Shukla, P., Sakure, A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., Das, S., . . . Hati, S. (2023). Antidiabetic, angiotensin-converting enzyme inhibitory and anti-inflammatory activities of fermented camel milk and characterisation of novel bioactive peptides from lactic-fermented camel milk with molecular interaction study. *International Journal of Dairy Technology, 76*(1), 149-167. doi:https://doi.org/10.1111/1471-0307.12910

Singh, B. P., Bangar, S. P., Alblooshi, M., Ajayi, F. F., Mudgil, P., & Maqsood, S. (2023). Plant-derived proteins as a sustainable source of bioactive peptides: recent research updates on emerging production methods, bioactivities, and potential application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63*(28), 9539-9560. doi:10.1080/10408398.2022.2067120

Singh, B. P., & Vij, S. (2017). Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality. *LWT, 86*, 293-301. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.013

Sosalagere, C., Adesegun Kehinde, B., & Sharma, P. (2022). Isolation and functionalities of bioactive peptides from fruits and vegetables: A reviews. *Food Chemistry, 366*, 130494. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130494

Şanlıdere Aloğlu, H., & Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science, 94*(11), 5305-5314. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2011-4285

Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., & Hassan, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Science and Biotechnology, 26*(5), 1325-1332. doi:10.1007/s10068-017-0160-9

Tavakoli, M., Habibi Najafi, M. B., & Mohebbi, M. (2019). Effect of the milk fat content and starter culture selection on proteolysis and antioxidant activity of probiotic yogurt. *Heliyon, 5*(2), e01204. doi:https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01204

Teschemacher, H., Koch, G., & Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Peptide Science, 43*(2), 99-117. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<99::AID-BIP3>3.0.CO;2-V

Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science, 86*(7), 2288-2296. doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73821-1

Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology, 36*(2), 137-143. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science, 77*(1), R11-R24. doi:https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x

Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology, 108*, 27-39. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002

Uluko, H., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., . . . Lv, J. (2013). Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates *in vitro* after ultrasound pretreatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 20*, 133-139. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.08.012

Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods, 18*, 1138-1146. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.024

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. doi:10.1017/S0022029919000384

Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal, 18*(7), 714-728. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004

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. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.032

Vásquez-Villanueva, R., Muñoz-Moreno, L., José Carmena, M., Luisa Marina, M., & Concepción García, M. (2018). *In vitro* antitumor and hypotensive activity of peptides from olive seeds. *Journal of Functional Foods, 42*, 177-184. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.062

Wali, A., Ma, H., Aadil, R. M., Zhou, C., Rashid, M. T., & Liu, X. (2017). Effects of multifrequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis, ACE inhibitory activity, and the structure characterization of rapeseed protein. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(6), e13413. doi:https://doi.org/10.1111/jfpp.13413

Wang, J., Shao, B., Li, J., Wang, Z., Zhang, M., Jia, L., . . . Ma, C. (2023). Identification and *in silico* analysis of ACE-inhibitory peptides derived from milk fermented by *Lacticaseibacillus paracasei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71*(33), 12462-12473. doi:10.1021/acs.jafc.2c09148

Wang, M.-P., Lu, W., Yang, J., Wang, J.-M., & Yang, X.-q. (2017). Preparation and characterisation of isoflavone aglycone-rich calcium-binding soy protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology, 52*(10), 2230-2237. doi:https://doi.org/10.1111/ijfs.13502

Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry, 67*, 46-54. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.007

Yan, Y., vd. (2021). Advances of peptides for antibacterial applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 202*, 111682. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111682

Yu, L. J., Ngadi, M., & Raghavan, V. (2012). Proteolysis of cheese slurry made from pulsed electric field-treated milk. *Food and Bioprocess Technology, 5*(1), 47-54. doi:10.1007/s11947-010-0341-5

Yust, M., x, a, M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., . . . Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry, 81*(3), 363-369. doi:https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00431-4

Zhang, M., & Mu, T.-H. (2017). Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 43*, 92-101. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.001

Zhou, T., Huo, R., Kwok, L.-Y., Li, C., Ma, Y., Mi, Z., & Chen, Y. (2019). Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. *Journal of Dairy Science, 102*(1), 223-235. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2018-14602

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Kayacan Çakmakoğlu, S., Sağdıç, O. (2021). Laktik asit bakterileri ile biyoaktif peptid üretimi. 4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021), Ankara, Türkiye, 24 - 26 Kasım 2021, ss.290. (Sözlü Sunum).

Makaleler

1. Kayacan Çakmakoğlu, S., Dere, S., Bekiroğlu, H., Bozkurt, H., Karasu, S., Dertli, E., Türker, M., Sağdıç, O. (2024). Production of bioactive peptides during yogurt fermentation, their extraction and functional characterization. *Food Bioscience, 61,* 104805. doi: https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104805