

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KOKOREÇTE BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ
VE BUNLARIN LABORATUVAR ORTAMINDA
ANTIOKSİDATİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE DOĞAN

DENİZLİ, MAYIS 2024

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**KOKOREÇTE BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ
VE BUNLARIN LABORATUVAR ORTAMINDA
ANTIOKSİDATİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE DOĞAN

DENİZLİ, MAYIS 2024

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022FEBE055 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

MERVE DOĞAN

ÖZET

**KOKOREÇTE BİYOAKTİF PEPTİTLERİN BELİRLENMESİ VE
BUNLARIN İN VİTRO ANTIOKSİDATİF ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MERVE DOĞAN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN GÖKÇE)**

DENİZLİ, MAYIS- 2024

Kokoreç, ülkemizde sık tüketilen sakatatlardan biridir. Literatür incelendiğinde kokoreçte biyoaktif peptitlerin analizi ve aminoasit profillerinin incelenmesi konusunda çalışmaya rastlanmadığı için kokoreçte biyoaktif peptitlerin incelenmesi araştırma konusu olarak tercih edilmiştir. Çalışmada temizlenmiş ve 1. pişirme işlemleri tamamlanmış kokoreçten biyoaktif peptitler izole edilmiş bunların biyoaktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla kokoreçten elde edilen ekstraktlar, hazırlanan solüsyonla beraber HPLC cihazından geçirilerek fraksiyonları toplanmıştır. Toplanan peptit ve protein fragmentleri, HPLC-DAD cihazı ile aminoasit analizi yapılarak içerdiği aminoasitlerine ayrılan bileşen konsantrasyonuyla bağlantılı olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak ANOVA analizi yapılmış ve sonuçlar özetleme ve grafikleştirme ile istatistiksel açıdan incelenmiştir. Toplanan peptit ve protein fragmentleri LC/MS cihazında incelenerek peptit dizilimleri elde edilmiştir. Bu dizilimler BIOPEP veri tabanı ile incelenerek biyoaktif peptit aktiviteleri tespit edilmiştir. Ayrıca kokorecin antioksidan aktivitesinin incelenmesi spektrofotometre ile DPPH analizi ile hesaplanarak kokoreç peptitlerinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Biyoaktif peptit, Kokoreç, Antioksidan, HPLC

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDES IN KOKOREC AND STUDY OF THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES IN VITRO

MSC THESIS

MERVE DOĞAN

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
FOOD ENGINEERING**

(SUPERVISOR:PROF. DR. RAMAZAN GÖKÇE)

DENİZLİ, MAY 2024

Kokorec is one of the most commonly consumed offal in Türkiye. Since there are no studies on the analysis of bioactive peptides and amino acid profiles in kokorec in the literature. The aim of the study was to investigate the bioactivity of the cleaned and pre cooked kokorec samples in vitro and to investigate the kokorec sample from different parts with amino acid analysis and antioxidant activities. For this reason, the extracts obtained from kokorec were passed through the HPLC device with the prepared solution and the fractions were collected. The aim here is to separate the sample into its compounds and analyse the peaks for each compound. Amino acid analysis is an important approach for the characterisation of protein and peptide based products. In addition, the amino acid composition determined can provide a measure of sample purity by confirming sample identity. For this purpose, the collected peptide and protein fragments were determined in relation to the concentration of the component separated into its amino acids by Amino Acid Analysis with HPLC-DAD device. Based on these results, ANOVA analysis was performed and the results were statistically analyzed by summarizing and graphing. The results showed that there was a strong correlation between the amino acid species, samples and their abundance. The collected peptide and protein fragments were analyzed by LC/MS liquid chromatography and peptide sequences were obtained (Ege MATA). These sequences were analyzed by BIOPEP database and bioactive peptide activities were determined. In addition, in order to examine the antioxidant activity of kokorec, it was determined that kokorec peptides have antioxidant activity with DPPH analysis.

KEY WORDS: Bioactive Peptides, Kokorec, Antioxidant, HPLC

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ŞEKİL LİSTESİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Türk Toplumunda Et ve Sakatat Tüketimi	1
1.2 Gıdalarda Biyoaktif Peptitler.....	2
1.3 Problemin Tanımı.....	3
1.4 Tezin Amacı	3
1.5 Tezin Önemi ve Literatüre Katkısı	3
2. KOKOREÇ.....	4
2.1 Kokoreç Tanımı ve Tüketimi	4
2.2 Kokoreç Pişirme Öncesi Hazırlık Aşaması	4
2.3 Kokorecin Besin Değeri	5
3. BİYOAKTİF PEPTİTLER.....	6
3.1 Biyoaktif Peptit Tanımı	6
3.2 Biyoaktif Peptit Kaynakları.....	6
3.3 Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığına Yararları	7
3.3.1 Antioksidan Aktivite	8
3.3.2 ACE İnhibisyonu, Antihipertansif Etki.....	10
3.3.3 Antimikrobiyal Aktivite	11
3.3.4 Antitrombotik Aktivite.....	12
3.3.5 Antikanser Aktivite	12
3.3.6 Antiobezite Aktivite	13
3.3.7 Antidiyabetik Aktivite.....	13
3.3.8 Opioid Aktivite	14
3.4 Biyoaktif Peptit Üretim Yöntemleri	15
3.5 Etteki Biyoaktif Peptit Türleri	19
3.5.1 Histidil dipeptitler	19
3.5.2 L-Karnitin.....	19
3.5.3 Diğer biyoaktif bileşenler.....	19
3.6 Biyoaktif Peptitlerin Güvenliği	20
4. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	22
4.1 Kokoreç ile İlgili Literatür Araştırması.....	22
4.1.1 Kokorecin Mikrobiyolojik Olarak İncelenmesi	22
4.2 Biyoaktif Peptitlerle İlgili Literatür Araştırması	23
4.2.1 Farklı Et Ürünlerinde Biyoaktif Peptit İncelenmesi.....	24
4.2.2 Biyoaktif Peptitlerin Kullanım Alanları.....	25
4.2.3 Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığına Yararları.....	25

5. MATERYAL VE METOT.....	27
5.1 Materyal.....	27
5.1.1 Kokoreç Örneği.....	27
5.1.2 Alet Ekipman Tanımları.....	27
5.1.3 Kullanılan Kimyasallar	28
5.2 Metot	28
5.2.1 Kokoreç Örneklerinden Peptitlerin Ekstraksiyonu	28
5.2.2 Enzimatik Hidroliz	28
5.2.3 HPLC ile Fraksiyonların Toplanması	29
5.2.4 HPLC-DAD ile Aminoasit Analizi	29
5.2.5 LC/Q-TOF /MS ile Biyoaktif Peptit Diziliminin Belirlenmesi.....	31
5.2.6 Biyoaktif Peptit Veritabanları ile Peptitlerin Tanımlanması.....	33
5.2.7 DPPH Radikali ile Antioksidan Aktivite İncelemesi	33
5.2.8 Verilerin İstatistiksel Analizi	34
6. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
6.1 HPLC ile Fraksiyon Toplama.....	36
6.2 HPLC-DAD ile Aminoasit Analizi	37
6.3 LC/Q-TOF /MS ile Biyoaktif Peptit Diziliminin Belirlenmesi	38
6.4 Biyoaktif Peptit Veritabanı ile Peptitlerin Tanımlanması	44
6.5 DPPH ile Antioksidan Aktivite	45
6.6 Aminoasit Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	46
7. TARTIŞMA.....	48
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
9. KAYNAKLAR	52
10. EKLER.....	62
11. ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1: Biyoaktif peptit elde edilme ve belirlenme aşamaları.....	15
Şekil 3.2: Biyoaktif peptit üretim yöntemleri.....	16
Şekil 3.3: Enzimatik hidroliz gösterimi.....	17
Şekil 5.1: HPLC-DAD Cihazı.....	30
Şekil 5.2: Agilent 6550 QTOF LC/MS cihazı.....	32
Şekil 5.3: SPSS'te tanımlanan veri seti.....	35
Şekil 6.1: HPLC 1. Yükleme grafiği.....	36
Şekil 6.2: HPLC 5. Yükleme grafiği.....	37
Şekil 6.3: HPLC 6. yükleme grafiği.....	37
Şekil 6.4: (A)PQLSY(G) dizilimli peptit grafiği.....	38
Şekil 6.5: (F)DIGSVCF(L) dizilimli peptit grafiği.....	39
Şekil 6.6: (I)KGHRGF(S) dizilimli peptit grafiği.....	39
Şekil 6.7: (W)KPVPCQI(C) dizilimli peptit grafiği.....	40
Şekil 6.8: (L)GAPGPSGA(R), (L)QGPPGSA(G) ve (A)VSPPTL(S) dizilimli peptit grafiği.....	40
Şekil 6.9: (L)QGSNEIEI(R) dizilimli peptit grafiği.....	41
Şekil 6.10: (F)PGPKGAA(G) dizilimli peptit grafiği.....	41
Şekil 6.11: (L)CDDVI(C) dizilimli peptit grafiği.....	42
Şekil 6.12: (A)DGQPGA(K) dizilimli peptit grafiği.....	42
Şekil 6.13: (L)SAHGPPA(L) dizilimli peptit grafiği.....	42
Şekil 6.14: (A)NGAPGI(A) dizilimli peptit grafiği.....	43
Şekil 6.15: (I)GSVCF(L) dizilimli peptit grafiği.....	43
Şekil 6.16: (L)CDDVI(C) dizilimli peptit grafiği.....	44
Şekil 6.17: Tespit edilen aminoasitlerin grafik gösterimi.....	47
Şekil A.1: Örnek 1'in HPLC-DAD dedektör grafiği.....	62
Şekil B.1: Örnek 2'nin HPLC-DAD dedektör grafiği.....	63
Şekil C.1: Örnek (1 ve 2)'nin HPLC-DAD dedektör grafiği.....	64

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Türk gıda kodeksi mikrobiyolojik kriterler tebliği	5
Tablo 5.1: HPLC cihaz metodu	31
Tablo 5.2: HPLC zamana göre mobil faz akışı	31
Tablo 5.3: Cihaz donanım ve özellikleri	32
Tablo 6.1: Aminoasit analizi sonuçları	37
Tablo 6.2: Peptit dizilimlerine göre aktiviteleri	44
Tablo 6.3: Spektrofotometrede okunan değerler	45
Tablo 6.4: SPSS aminoasit adı kodlama	46
Tablo 6.5: ANOVA sonucuna göre veri tanımlamaları	46
Tablo 6.6: ANOVA sonuçları	47

SEMBOL LİSTESİ

TAMB	: Toplam Aerop Mezofilik Bakteri
TAPB	: Toplam Aerop Psikrofilik Bakteri
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Rekatif Azot Türleri
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzimi
VTE	: Venöz tromboembolizm (Hastalık ismi)
MALDI-MS	: Matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
DFBP	: Gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerden oluşan bir veri tabanı
ARA	: Antiradikal Aktivite
BIOPEP	: Profiles of proteins potential biological activity (Proteinlerin potansiyel biyolojik aktivite profilleri)
dk	: dakika
cm	: santimetre
mm	: milimetre
nm	: nanometre
µm	: mikrometre
µL	: mikrolitre
kDa	: kilodalton
g	: gram
mg	: miligram

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez konumun belirlenmesinden itibaren planlanması ve çıktıların yorumlanmasında fikirleriyle destek olan bu sayede gelişimime katkı sağlayan çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Ramazan GÖKÇE'ye,

Değerli fikirleri ile analizlerimde yardımcı olan Arş. Gör. Duygu ZEHİR ŞENTÜRK'e ve bölümümüzün tüm öğretim üyelerine,

Analizlerimde ve metot geliştirme sürecimde desteklerini hiç esirgemeyen sayın Öğr. Gör. Figen YÜCE'ye,

Çalışmamın ilerlemesinde gerekli olanakları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığına ve üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Maddi, manevi destekleriyle beni bugünlere getirmek için sonsuz çaba harcayan kıymetli aileme ve yardımlarıyla bana her daim destek olan sevgili eşime,

Teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Türk Toplumunda Et ve Sakatat Tüketimi

Gıda tüketimi tüm canlılar için yaşamsal bir zorunluluk olsa da sadece biyolojik bir eylem olarak görülmemekte; gıda ürünlerinin üretimi, depolanması ve tüketimi aşamalarında farklı kültürel ve sosyal öğeleri kapsamı yönüyle insanların yaşamında önemli bir yer edinmektedir. Bu sebeple farklı kültür ve sosyal alanlardaki yemek anlayışları ve tercih edilme oranları da farklılık göstermektedir.

Türk kültüründe, et ve sakatat tüketimi oldukça yaygın görülmektedir. Özellikle fast food tüketiminin de artmasıyla beraber en çok tüketilen 15 fast food içinde döner, lahmacun, pide, hamburger, pizza, tavuk, balıklı sandviç ve kokoreç olmak üzere et ürünlerinin oldukça yaygın olduğu belirtilmiştir (Anıl ve diğ. 2011). İnsanların gıdalar içerisinde hayvansal gıda tüketmeleri, hayvansal gıdaların içeriği nedeniyle en değerli protein kaynakları olmasıdır. Çünkü hayvansal proteinler içerik olarak yüksek oranda esansiyel aminoasitleri içermektedirler. Et ve sakatatlar; proteini yüksek kalite ve miktarda; demir, magnezyum, çinko, fosfor gibi mineralleri ayrıca B12, B6 ve B1 vitaminleriyle ω -3 ve ω -6 yağ asitlerini içermesiyle ideal gıda maddeleri olarak görülmüştür (Gökcalp ve diğ. 2001).

Kasaplık hayvanların kesimiyle elde edilen tüketilebilir iç organlar (karkas hariç) "sakatat" olarak isimlendirilmektedir. Sakatat olarak; kalp, böbrek, beyin, karaciğer, işkembe, paça, ince bağırsak örnek verebilir. Bu organlar kırmızı etle kıyaslandığında daha fazla su içerirler fakat yağ oranları düşüktür. Karbonhidrat oranı incelendiğinde de kırmızı ete oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Sakatatlar vitamin ve mineral açısından etten daha zengin gıdalar olarak görülmüş özellikle karaciğer, böbrek, dalak ve beyinin en çok mineral içeren organlar olduğu tespit edilmiştir (Karakaya 2013).

Kokoreç, ince bağırsağın ön işlemlerden geçirilerek şişlere sarılmasıyla üretilmektedir. Türklerde en az bin yıldır var olan bir yiyecektir. Türklerin at

üzerinde ve göçebe olarak yaşamaları; tarım yerine hayvancılık kültürünü benimsemeleri, et ve yan ürünlerinin yaygınlığını kanıtlar niteliktedir.

Kokoreç yemeğine benzer tarifin verildiği ilk kaynak Kaşgarlı Mahmud'un Divan-ü Lügat-it-Türk adlı eseri olarak verilebilir. Bu eserde geçen "İşkembe ve bağırsak incecik kıyılır, bağırsak içerisine konur, kızartılarak yahut pişirilerek yenir." ifadesiyle bahsedilen "yörgemeç" yemeği incelendiğinde 1070 yıllarında Türklerde kokoreç benzeri yiyeceklerin yapıldığı hakkında çıkarım yapılmasını sağlamıştır (İnanöz ve diğ. 2022).

Kokoreç tarifinden bizzat kokoreç adıyla bahseden en eski kaynak Ayşe Fahriye tarafından yazılmış ve ilk baskısı 1894 yılına ait olan Osmanlı dönemine ait "Ev Kadını" isimli yemek kitabıdır. Bu kitap incelendiğinde kokorecin Türk evlerinde de yapıldığı görülmektedir. Günümüzde 'Kokorecin başkenti' olarak bilinen Balıkesir ilinde ilk olarak 1980-1985 tarihleri arasında kokoreç yapıldığı bilinmektedir. Bu tarih süreci incelendiğinde Türk kültüründe ve şimdilerde de yaygın olarak tercih edilen bu lezzetin araştırma konusu olması oldukça önemli bir geçmişe dayandırılmaktadır.

1.2 Gıdalarda Biyoaktif Peptitler

Gıdalardaki biyoaktif peptitler, metabolik regülasyon ve modülasyonda önemli etkileri olan spesifik protein fragmentleridir. Biyoaktif peptitler canlı sistemlerde hücreler tarafından aktif olarak üretilebildiği gibi, proteinlerin içerisinde pasif olarak da bulunabilirler. Kozmetik, sentetik ilaç ve gıda takviyelerinde etkili bir alternatif olan biyoaktif peptitler, elde edilen kaynağın biyolojik izlerini taşımaktadır. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan üretilen biyoaktif peptitler doğal immün sisteme de katkı sağlayarak kronik hastalık riskini azaltmaktadır. Bu bağlamda gerek endojen gerekse eksojen kaynaklardan peptitlerin eldesi ve potansiyel etkilerinin bulunması ile yeni biyolojik aktif peptitlerin farklı kaynaklardan eldesi ve tanımlanması son zamanlarda üzerinde yoğunlukla çalışılan konular arasında yer almaktadır.

1.3 Problemin Tanımı

Yukarıda detaylı olarak verilen Türk toplumunda kokoreç tüketimi ve ilerleyen bölümlerde bahsedilecek olan Biyoaktif peptitlerin insan sağlığına etkisi ve ette bulunması ile ilgili çalışmalar incelendiğinde kokoreç içerisinde bulunan Biyoaktif peptitlerin ne olduğu bu çalışmada belirlenen ana problemdir. Problemin tanımlanmasında yapılan literatür araştırmaları ile ette yapılan çalışmaların incelenmesiyle edinilen fikir etkili olmuştur.

1.4 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, Kokoreç içerisinde bulunan Biyoaktif peptitlerin belirlenmesiyle ortaya çıkan analiz sonuçlarının yorumlanarak bulunan peptitlerin insan sağlığı açısından hangi katkıları olacağına belirlenmesi, ardından bu peptitlerin ne amaçlarla kullanılabilmesi hakkında önerilerde bulunarak farklı bakış açıları geliştirilmesini sağlamaktır.

1.5 Tezin Önemi ve Literatüre Katkısı

Biyoaktif peptitler ile ilgili yapılan literatür araştırmaları sonucunda bu konuda etle ilgili çalışmalar yapılmış olsa da kokoreçte biyoaktif peptitlerin belirlenmesiyle ilgili çalışmalar ve bulgulara rastlanmamıştır. Bu durum özellikle kokoreç tüketiminin dünya genelinde yaygın olmaması sebebiyle araştırmacıların söz konusu ürünü çalışma gereksinimi duymaması ile ilgili olabilir. Fakat bu yiyeceğin Türkiye’de yaygınlığı göz önüne alındığında çalışmaların gerekliliği ve bulunabilecek peptit türlerinin kullanımının anlaşılmasının literatüre katkı sağlayacağı ön görülmüştür.

2. KOKOREÇ

2.1 Kokoreç Tanımı ve Tüketimi

Kokoreç, çoğunlukla küçükbaş kasaplık hayvanlardan özellikle lezzet açısından süt kuzusundan elde edilen, hayvanların özel olarak temizlik işlemlerinden geçirilmiş ince bağırsağıdır. Temizlenen bağırsak, çöz (mezenterial) yağların şişe geçirilmesinden sonra üzerine sarılmaktadır. Şişlere sarılan bağırsakların tuz, zeytinyağı, limon ve diğer baharatlarla marine edilmesi yaygın olarak kullanılmakta ve bu yöntemle ısıtma işlemi hazır hale getirilmektedir. İlk olarak hafif ısıtma (ön pişirme) işlemi tabii tutulduktan sonra genellikle kömür ızgaralarında pişirilmektedir. Izgara dışında kızartma, haşlama sote veya tandır şeklinde pişirilmesi de tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Bilgin ve diğ. 2008). Pişirme işleminden sonra genellikle tuz, kırmızı toz biber, kimyon ve kekik eklenerek turşu ile beraber servis edilmektedir (Temelli ve diğ. 2002).

2.2 Kokoreç Pişirme Öncesi Hazırlık Aşaması

Gıda güvenliği, gıdalarda oluşabilecek her türlü fiziksel, kimyasal, biyolojik zararların önlenmesi ve ortadan kaldırılması için alınan tedbir ve kontrolleri ifade eder. Etkin gıda güvenliğinin sağlanabilmesi tüketici ve toplum sağlığı açısından kritik önem taşımaktadır. Günümüzde gıda güvenliği konusunda devletlerin aldıkları önlemler sayesinde tüketici bilinçlendirilmekte ve yapılan araştırmalar artarak en önemli toplumsal tartışma konularından biri haline getirilmektedir.

İşkembe, İnce bağırsak, Paça gibi sakatatlar bazı ön işlemlerden geçirildikten sonra tüketime hazır hale gelmektedir (Öztan, 2005). Kokoreç hazırlanırken bağırsağın mikroflorası kullanılan bağırsağa göre değişkenlik göstermekte ve hazırlık aşamasında ilk dikkat edilmesi gereken husus olarak görülmektedir. Yaygın olarak tüketilen kokoreçe özel mikrobiyolojik limit veya sınırlama bulunmamaktadır. Fakat genel olarak Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde Sakatat kategorisinde verilen kriterler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Türk gıda kodeksi mikrobiyolojik kriterler tebliği

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler ⁽¹⁾	
		n	c	m	M
3.Et ve Et Ürünleri					
3.1. Karkas, parça etler, kıyma ve sakatat					
3.1.2. Sakatat	<i>C.perfringens</i>	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

Kokoreç, doğal yapısı gereği dışkıyla kontamine olması söz konusu olabileceğinden gıda zehirlenmelerine neden olabilme ihtimali çok yüksektir. Bu sebeple temizleme işleminin uygun ve hassas şekilde yapılması oldukça önemlidir (Bilgin ve diğ. 2008). Diğer dikkat edilmesi gereken hususlar ise hazırlanan ürünlerin uygun saklama koşullarında muhafaza edilmesi, ürünün tüketiciye sunulduğu ortamın hijyenik olması, bağırsak ve diğer ürünlere uygulanan ısı işlemlerin doğru sıcaklık ve süre içerisinde yapılmasıdır.

2.3 Kokorecin Besin Değeri

Kokorecin hazırlama hijyen ve kalite koşulları sağlandığında içerisindeki vitamin ve mineraller insan sağlığına katkıda bulunmaktadır. Kokoreç içerdiği yağa bağlı olarak A, D, E, K vitaminleri; potasyum, kalsiyum, bakır, çinko ve demir içermektedir (Çifçi, Kasım 2023'te erişildi). Elbette kokoreç yağlı bir ürün olarak kolesterol de içermektedir. Bu yüzden uygun koşullarda üretilen ürünleri uygun porsiyonlarda tüketmek gerekmektedir.

3. BİYOAKTİF PEPTİTLER

3.1 Biyoaktif Peptit Tanımı

Biyoaktif peptitler, tek hücreli ya da çok hücreli organizmalar üzerinde biyolojik etkiler gösteren yaklaşık 2-20 amino asitten oluşan kısa polimerlerdir ve proteinlere kıyasla nispeten düşük molekül ağırlığına (<10 kDa) sahiptirler. Bazı biyoaktif peptitlerin istisna olarak 20'den fazla aminoasit içerdiği bildirilmiştir (Adje ve diğ. 2011; Madhu ve diğ. 2022). Biyoaktif peptitlerin moleküler ağırlığı ne kadar düşük olursa, peptitin ince bağırsakta emilme ve biyolojik etkilerini gösterme olasılığı da o kadar artmaktadır (Escudero ve diğ. 2013; Rezaharsanto ve Subroto 2019). Biyoaktif peptitler ham maddelerde doğal olarak bulunabilmektedir veya hidroliz, pişirme veya fermantasyon yoluyla üretilmektedir. Bu peptitler, doğal protein zincirlerinde biyoaktif olmasalar da serbest bırakıldıktan sonra aktif hale getirilerek sağlığa faydalı fonksiyonel özelliklere dönüştürülmektedir. Bu biyoaktif özellikler fermantasyon, enzimatik hidroliz ve gastrointestinal (GI) sindirim yoluyla tetiklenebilmektedir.

Farklı et kaynakları farklı biyoaktif peptitler içerir. 'BIOPEP' adlı veri tabanında 1500'den fazla farklı biyoaktif peptit türü rapor edilmiştir. (Singh ve diğ. 2014). Aynı tür etten elde edilen biyoaktif peptitler bile farklı içeriklere sahip olabilmektedir. Bazı biyoaktif peptitlerin içeriği aynı zamanda üretim sistemine, tüketilen gıda/yem bileşimine ve besleme düzenine de bağlı olarak değişmektedir (Rezaharsanto ve Subroto 2019).

3.2 Biyoaktif Peptit Kaynakları

Biyoaktif peptit elde etmek için yaygın olarak, deniz ürünleri, balık, peynir, sığır testisi, süt, domuz eti gibi hayvansal kaynakların yanı sıra fasulye, pirinç ve buğday proteinleri, brokoli, soya fasulyesi, mısır gibi protein açısından zengin bitkisel gıda maddeleri kullanılmaktadır. Aynı zamanda mikro algler ve mantarlar, bira mayası ve mantar da biyoaktif peptit kaynakları olarak kullanılmaktadır. Bu

kaynakların yüksek besin değerlerine ek olarak, geniş bir yelpazede çeşitli fizyolojik aktivite sağladıkları bilinmektedir.

Et; yapısında su, lipitler, mineraller, karbonhidratlar, vitaminler ve diğer biyoaktif bileşiklerin bulunması nedeniyle önemli bir biyoaktif peptit kaynağı olarak kabul edilmektedir (Rezaharsanto ve Subroto 2019). Farklı hayvanların et özellikleri, bileşen farklılıkları ve tüketildikten sonra bunların çözünmesi açısından karakteristik özelliklere sahip olmaktadır. Sığır, domuz, kümes hayvanları ve koyunların iskelet kası proteinleri farklı izoelektrik noktaları ve moleküler ağırlıklarına sahiptir (Farag ve diğ. 2015). Özellikle sığır etindeki peptit salınımının domuz eti ve hindiden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Burada dikkat edilecek nokta, ana protein zincirinden salınan her peptitin biyoaktif olmamasıdır. Çünkü her peptit besin değeri katkısının yanı sıra insanlar üzerinde fizyolojik olarak hormon benzeri etkiye sahip değildir (Keşka ve diğ. 2019). Sığır eti içerdiği aminoasitler sayesinde insanlar için yüksek kaliteli diyet proteinlerinin önemli bir kaynağı olarak görülmektedir. Sığır etinin biyoaktif bileşiği büyük ölçüde lif bileşimine ve kas dokusuna bağlıdır. Ayrıca aerobik metabolizması yüksek olan kaslar daha fazla koenzim Q10 ve taurin içerirken karnosin ve kreatin içeriği daha azdır (Purchas ve diğ. 2005).

Keşka ve diğ. (2019), LC-MS/MS kromatografisini kullanarak Limuzin sığırlarının semimembranosus kasında 7 ila 21 amino asitten oluşan 62 peptit içeren ve biyoaktivite indeksi 0,5'ten büyük olan 452 peptitin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

3.3 Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığına Yararları

Bulaşıcı olmayan hastalıkları önleme potansiyelleri nedeniyle uygun miktarlarda besin ve biyoaktif bileşiklerin tüketilmesine yönelik ilgi ve araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Biyoaktif peptitler, yapılan çalışmalarla birlikte insan sağlığını nihai olarak etkileyen bir gıda bileşeni olarak tanımlanmıştır. Özellikle vücut durumu ve işlevi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır (Kitts ve Weiler 2003). Son birkaç on yılda, biyoaktif peptitlerin üretimi ve özelliklerinin keşfi, bilim insanları tarafından birçok makalede yaygın bir şekilde ele

alınmaktadır. Bu protein parçaları, başlangıçtaki proteinin kökenine göre kategorize edilmekte ve farklı gıdalardan üretilme denemelerine devam edilmektedir. Peptit zincirinin tespit edilen işlevleri, protein dizisinin kökeninde tanımlanmıştır. Bu kısa amino asit zinciri genellikle işlevsel olarak etkisizdir ancak bu peptitlerin doğal proteinden serbest bırakılmasıyla, gıda tüketimi ve işlenmesi sırasında mide sindirim enzimleri tarafından gıda hidrolizi yoluyla veya özellikle fermantasyon sırasında mikrobiyal enzimlerin etkisiyle peptitlerin aktif formu elde edilmektedir (Pihlanto-Leppala 2001; Erdmann ve diğ. 2008; Pedrouso ve diğ. 2023).

Biyoaktif peptitler, çocuklar ve yaşlılar gibi hassas popülasyonları desteklemek gibi belirli amaçlar için diyetlere dahil edilebilir. Bu nedenle biyoaktif hidrolizatlar, olumlu fizyolojik ve sağlık etkilerine sahip takviye gıdalar oluşturmak için umut verici bir seçenektir.

Farklı bakış açısıyla biyoaktif peptitler tat, koku ve doku gibi duyuşal özellikler açısından et ürünlerinin kalitesini ve raf ömrünü artırma potansiyeline sahiptir. Peptitlerin işlevsel özelliğini düzenleyen kritik unsurlardan biri biyoaktif peptitlerin moleküler ağırlığıdır. Bu sebeple biyoaktif peptitlerin biyolojik aktivitesi incelenirken moleküler ağırlığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

3.3.1 Antioksidan Aktivite

Son yıllardaki teknolojik gelişmeler insan yaşam tarzında köklü değişikliklere neden olmuştur. İnsanların fiziksel aktivitelerinin azalmasıyla, gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlardaki insanlarda özel bir stres türü olarak kabul edilebilecek kardiyovasküler komplikasyonlar ve farklı kanser türleri de dahil olmak üzere bazı hastalıkların görülme sıklığı artmıştır. Stresin gerçek tanımına bakıldığında, vücudun telafi edici yeteneklerini tehdit eden veya bozan herhangi bir faktöre karşı homeostazı korumak için organizmanın verdiği genel ve spesifik olmayan tepkidir (Lundberg 2006; Akbarian ve diğ. 2022). Genel tanımıyla stres, kişinin fiziksel ve ruhsal dengesini bozan, psikosomatik sorunlara neden olan ve kişinin yaşamın çeşitli alanlarındaki verimliliğini azaltan bir faktör olarak tanımlanmaktadır (Pitkänen ve diğ. 2007). Oksidatif stres ise, pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin değişmesidir; oksidatif stres, reaktif oksijen/azot türlerinin (ROS/NOS) üretimi ile

antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla oksidatif stres, pro-oksidanlar/antioksidanlar arasındaki dengeyi prooksidanlar lehine değiştirerek potansiyel olarak biyolojik hasarlara yol açmaktadır. ROS üretimi ile ilişkili hastalıklar olarak kanser, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları örnek verilebilmektedir (Almroth ve diğ. 2008; Akbarian ve diğ. 2022).

Oksidatif stres, lipidler, nükleik asitler ve proteinler de dahil olmak üzere önemli hücresel makromoleküllerde ciddi hasara neden olabilmektedir. Biyolojik sistemlerde, ROS' un serbest radikallerinin üretimi kaçınılmazdır ve vücut antioksidan savunma mekanizmaları tasarlayarak zararlı etkilerini kısmen nötralize etmektedir. Enzimatik antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşenleri süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleridir (Akbarian ve diğ. 2022).

Serbest radikallere ve diğer reaktif türlere karşı güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olan antioksidan peptitler genelde 5-16 amino asit içermektedirler (Chen ve diğ. 1998). Gıda kaynaklı antioksidan peptitler, düşük moleküler ağırlığa, düşük maliyete, yüksek aktiviteye ve kolay emilime sahip güvenli ve sağlıklı bileşiklerdir (Akbarian ve diğ. 2022).

Sohaib ve diğ. (2017) çalışmalarında, yerel bir mezbahadan elde edilen sığıır hemoglobini hidrolize etmek ve peptiti izole etmek için pepsin kullanmışlardır. Et ürünlerine %0,5 (w/w) konsantrasyonda koruyucu olarak eklenen bu peptitin, etin acılaşmasını ve lipid oksidasyonunu %60'a varan oranda önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, peptitlerin gıda endüstrisinde umut verici teknolojik uygulanabilirliğini ve gıda endüstrisinde doğal koruyucular veya lezzet arttırıcılar olarak, ayrıca et ürünlerinin dokusunu ve besin değerini iyileştirmek için kullanılabileceğini göstermektedir.

Peptit boyutunun antioksidan aktivite üzerindeki etkisi incelendiğinde bir peptit dizisine ek olarak, peptitlerin moleküler ağırlığının antioksidan aktivitelerini etkileyebileceği görülmüştür (Mendis ve diğ. 2005). Araştırmacılar, mısır gluteni hidrolize proteinini incelediğinde molekül ağırlığı 500-1500 Dalton arasında olan peptitlerin antioksidan aktivitesi, molekül ağırlığı 1500 Dalton'dan yüksek veya 500

Dalton'dan düşük olan peptitlerden daha güçlü olduğunu görmüşlerdir (Li ve diğ. 2008). İncelemelerdeki bazı durumlarda, büyük zincirli peptitlerle kıyaslandığında daha küçük peptitlerin daha yüksek antioksidan gücü olduğu, serbest radikallere daha kolay erişmelerine ve bu radikallerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına bağlanmıştır (Ranathunga ve diğ. 2006). Bununla birlikte, hidroliz derecesi arttıkça peptitlerin antioksidan aktivitesinin azaldığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bunun nedeni, peptitlerin antioksidan aktivitesi çok az olan veya hiç olmayan serbest amino asitlere daha fazla parçalanmasıdır (Aluko 2015; Akbarian ve diğ. 2022).

Escudero ve diğ. (2013), indirgeyici güç analizi ve DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikal süpürme deneyi kullanarak antioksidan aktiviteye sahip bazı peptitleri tanımlamayı başarmışlardır; burada en güçlü radikal süpürme aktivitesini ve en yüksek indirgeme gücü gösteren peptitleri tanımlamışlardır (Rezaharsanto ve Subranto 2019)

3.3.2 ACE İnhibisyonu, Antihipertansif Etki

Hipertansiyon, birçok kardiyovasküler hastalığın ve buna bağlı ölümlerin ana nedenidir. Dünya yetişkin nüfusunun yaklaşık %30'unu etkilediği ve erken ölümlerden 7,6 milyonunun yüksek tansiyona bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Otte ve diğ. 2007; Özcan, Yardım, 2023). 2000 yılında dünyada 972 milyon hipertansiyon vakası tespit edilmiştir ve bu sayının 2025 yılına kadar 1,56 milyara ulaşması beklenmektedir (Pradeepa ve Mohan 2008). Hipertansiyona yaş, kalıtım özellikleri, vücut ağırlığı, yaşanan çevre ve beslenme koşullarının etkili olduğu görülmüş, önlenmesi ve kontrol edilmesinde ilaç tedavisi, sağlıklı şekilde kilo verilmesi, tuz ve yağ alımının azaltılarak alkol tüketiminin kısıtlanmasının etkili olduğu görülmüştür (Özcan, Yardım, 2023). Fakat tedavi amaçlı kullanılan ilaçların vücut üzerinde istenmeyen etkileri görülebilmektedir. Bu nedenle hipertansiyonun önlenmesi amacıyla üretilen doğal kaynaklar, gıda takviyeleri büyük ilgi görmektedir.

Renin anjiyotensin sistemi, kan basıncının önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), hipertansif (kan basıncını yükselten) etki göstererek kan basıncının düzenlenmesinde ve artmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca ACE'nin vücuttaki su dengesinin

ayarlanmasında da önemli olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, hipertansiyon için protein türevi olan ACE inhibitörü peptitler, önleyici gıdanın üretilmesi ve geliştirilmesinde potansiyel kaynak oluşturabilir. ACE inhibitörü peptitler pek çok gıda protein kaynağından elde edilebilir. Oldukça yaygın görülen hipertansiyona karşı ACE inhibitörü aktiviteye sahip gıdaların tüketilmesi ile bireylerin kan basıncında önemli oranda düşüş olduğu gözlenmiştir (Ryhanen ve diğ. 2001; Yüksel 2018).

Jang ve Lee (2005), sığır butundaki sarkoplazmik proteinlerinden elde edilen hekezapeptidin, %30 ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir.

Castellano ve diğ. (2013) domuz sarkoplazmik proteinlerinden elde edilen 50'den fazla peptidin alifatik (V, I ve A), bazik (R) ve aromatik (Y ve F) kalıntılar gibi hidrofobik ve prolin (P) gibi nötr kalıntıların yaygınlığını ve %54 ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiğini bulmuştur.

3.3.3 Antimikrobiyal Aktivite

Son yirmi yılda birçok canlıda antibakteriyel, antiviral ve antifungal aktivitelere sahip birçok peptit tanımlanmıştır ve bunlar doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Antimikrobiyal özellikli peptitler bakteriyel saldırılara karşı sentezlenen ilk kimyasal koruma olarak tüm canlılarda üretilmektedir. Bu savunucuların yetersiz görülmesi durumunda antibiyotiklere başvurulmaktadır (Hancock ve Diamond 2000). Fakat incelenen çoğu koşulda, antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizması genel olarak bilinen antibiyotiklerden farklı ve gelişmiş görünmektedir. Bu nedenle, bu peptitler bulaşıcı ajanlarla savaşmak ve bağışıklığı kuvvetlendirmek için yeni ilaçlar olarak çok ilgi çekicidir (Sato ve diğ. 2006).

Antimikrobiyal özellikli peptit dizilerine, yapı ve uzunluklarına göre farklılık göstermekte olup şimdiye kadar 700'den fazla antimikrobiyal özelliğe sahip peptit bulunmuştur (Papo ve Shai 2003). Ayrıca antimikrobiyal peptitler, özellikle proteinlerden çok daha basit yapıda olmaları, işlev-yapı ilişkisinin incelenmesini basitleştirmeleri ve biyolojik olmayan yollarla (kimyasal sentez gibi) inşa

edilmelerini mümkün kılmaları nedeniyle birçok bilim insanı ve araştırmacının dikkatini çeken çalışmalarda yeni bir sayfa açmıştır (Akbarian ve diğ. 2022).

Doğrudan etten elde edilen ve önemli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olan biyoaktif bir peptiti kanıtlayan az sayıda makale vardır. Antimikrobiyal olan bazı biyoaktif peptitler genellikle et yan ürünlerinden elde edilmektedir.

Jang ve diğ. (2008), *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *L. monocytogenes* üzerindeki, *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerindeki ve peptit dahil olmak üzere antimikrobiyal aktiviteye sahip sığır sarkoplazmik proteinlerinden türetilmiş çeşitli peptitler bulmuşlardır.

3.3.4 Antitrombotik Aktivite

Tromboz, kan damarlarında pıhtı oluşumu nedeniyle kan akışının zayıflama durumudur. Pıhtı oluşumu süreci, birçok faktörle beraber venöz tromboembolizm (VTE) veya akut koroner sendroma dönüşmektedir (Syed ve Mehta 2018). Bu VTE durumu genellikle arterlerde meydana gelmekte ve inmeye yol açmaktadır. Özellikle 50 yaşın üzerindeki birçok insanda sakatlığa hatta ölüme neden olabilen bir hastalıktır ve bu durum yılda 100 kişiden 1'ini etkileyebilmektedir (Mackman 2012).

Morimatsu ve diğ. (1996), papain enzimi ile hidrolize edilen domuz peptitlerinin antitrombotik aktivite ile ilişkili hipokolesterolemik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Shimizu ve diğ. (2009), saflaştırılmış domuz peptitinin antitrombotik aktiviteye sahip olduğunu ve bunun aspirin aktivitesiyle aynı etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Genel antitrombotik işlevi olmayan domuz etine kıyasla, bu domuz peptiti daha fazla izolösin, lösin ve fenilalanin içeriğine sahiptir ve bu antitrombotik aktivitenin varlığını kanıtlar niteliktedir.

3.3.5 Antikanser Aktivite

Çeşitli kanser hastalıkları, dünya genelinde ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Kanser hastalıklarının oluşma sebeplerinden %90-95'ini sigara ve alkol tüketimi, yanlış diyet yöntemleri, koruyucusuz ve yanlış zamanda güneşe maruz kalma,

çeşitli kirleticileri (hava, su, toprak vb.), enfeksiyon türleri, aşırı stres, fiziksel hareketsizlik ve obezite olduğu belirtilmiştir (Anand ve diğ. 2008). In vitro ve in vivo ortamda yapılan çalışmalarda çok çeşitli gıda bileşenlerinin kanser riskini azaltabileceği ortaya konulmuştur. Son yıllarda ise bu peptitlerin kullanımının, kanserin başlaması hatta ilerleme evrelerinde bile glutatyon sentezinin artmasıyla bağışıklık ve antioksidan aktivitenin uyarılmasıyla ilişkili olduğu belirtilerek antikanser aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (De Mejia ve Dia, 2010). Ayrıca antioksidan etkileri de bulunması sebebiyle kanser tedavisinin yan etkilerine karşı da olumlu etkisi bulunmaktadır.

3.3.6 Antiobezite Aktivite

Obezite, insan sağlığını olumsuz etkileyerek yaşam kalitesini düşürmesi hatta insan ömrünü kısaltması sebebiyle bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Yardım ve diğ. 2017). Ayrıca obezitenin dolaylı olarak hipertansiyon, kalp hastalıkları ve diyabet riskini artırdığına dair bulgular da bulunmaktadır. Belirli peptit dizilimine sahip protein hidrolizatlarının in vitro ve in vivo çalışmalar yapılarak hipolipidemik (lipit düşürücü) etki gösterdiği belirlenmiştir (Mazorra-Manzano ve diğ. 2017). Peptitler özellikle ince bağırsaklardaki besinlerin emilimini etkileyerek iştahı azaltabilir. Birçok çalışma, diyet proteinlerinden türetilen peptitlerin beyne tokluk sinyalleri gönderebildiğini ve böylece daha fazla gıda tüketimini önleyebildiğini göstermiştir (Nagoka ve diğ. 2001). Kazein türevi peptitlerin kolesistokinin A (CCK-A) reseptörünü aktive ederek vücutta yemek yemeyi düzenlediği gösterilmiştir (Pupovac ve Anderson 2002; Akbarian ve diğ. 2022).

3.3.7 Antidiyabetik Aktivite

Diyabet, pankreasın ürettiği insülin miktarındaki yetersizlikler veya salgılanan insülindeki etkisizlik nedeniyle ortaya çıkan, özellikle de gelişmiş ülkelerde pandemi düzeyine ulaşmış bir hastalıktır. Kandaki insülin yetersizliği kan şekerinin artmasına neden olmakta, kan damarları ve sinirler başta olmak üzere vücut dokularına zarar vermektedir (Ünal ve diğ. 2018).

Yeni tedavilerden biri, ağızdan uygulanan DPP-IV inhibitörü aktivitesinden elde edilmiştir. DPP-IV aktivitesi içeren çok sayıda biyoaktif peptit örneği, kimyasal olarak sentezlenen moleküller kadar olmasa da diyabet hastalığı için avantajlar sağlayan et ve yan ürünlerinden tanımlanmıştır (Bechaux ve diğ. 2019; Pedrouso ve diğ. 2023).

Yapılan çalışmada, domuz etinin in silico analiz ile gösterildiği kan glikoz seviyelerini kontrol etmek için potansiyel bir biyoaktif peptit kaynağı olduğu bildirilmiştir (Kęska ve diğ. 2019). Yapılan bir başka çalışmada kuru kürlenmiş jambonda tanımlanan birkaç peptitin, fonksiyonel gıdalarda veya farmasötik ürünlerde DPP-IV inhibe edici peptitler olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Gallego ve diğ. 2014; Mora, Gonzalez-Rogel ve diğ. 2020).

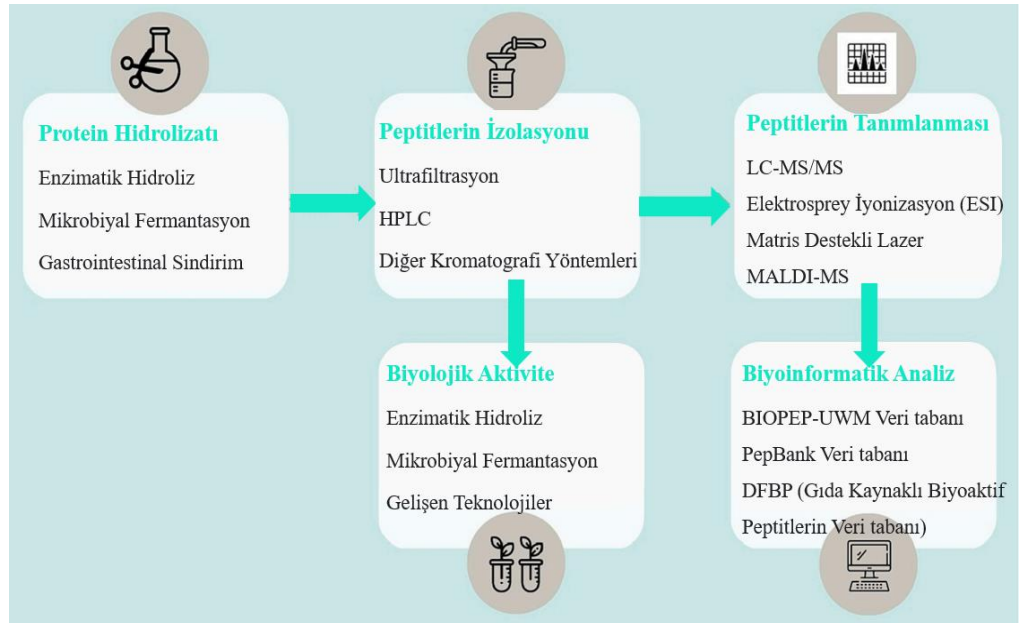
3.3.8 Opioid Aktivite

Ağrı, vücutta herhangi bir sorun olduğuna dair önemli bir işaret olsa da genellikle şiddetli ve yıkıcı uyarıların eşlik ettiği bir duygudur. Kronik ağrı ise yüksek düzeyde depresyon ve anksiyete ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ağrı oluşumuna bağlı olarak azalan fiziksel aktivite, obezite ve kalp hasarı gibi başka hastalıklara da neden olabilmektedir. Kronik ağrı beyin ve/veya omurilikten kaynaklandığından genellikle yönetimi zor olmaktadır (Pruimboom ve diğ. 2007). Opioid ilaçlar göz ardı edilemez yan etkilere sahip olmalarına rağmen, ağrıları dindirmek için halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Ağrı aynı zamanda kanserin yönetimi ve tedavisindeki en önemli zorluklardan biridir ve hastalarda psikolojik olarak olumsuz etkiye sahip olmaktadır. Kanser ileri evrelerinde ağrı görülme olasılığı %70 ila %80'e yakındır (Wootton ve Morphine 2004). Kanser metastazı geçirmiş hastaların %90'ında da ağrı görülmektedir (Haegerstam 2001).

Opioid etkili peptitler sütte doğal olarak bulunduğu gibi fermantasyon, olgunlaşma veya gastrointestinal sindirimle oluşturulabilmektedir. Bu peptitlerin iç kaynakları genellikle salgı bezleri tarafından salgılanan hormonlar ya da sinir hücreleri tarafından salgılanan bir nörotransmitter şeklindedir. Sindirim enzimleriyle sindirimde üretilen peptitlerin insanlara ağız yoluyla kolayca uygulanabildiğine dikkat etmek gerekmektedir (Akbarian ve diğ. 2022).

3.4 Biyoaktif Peptit Üretim Yöntemleri

Biyoaktif peptitler, öncül proteinden sindirim sistemindeki proteoliz prosesi ile kimyasal olarak veya mikroorganizmaların işlenmesi ve fermantasyonu sırasında in vitro hidroliz enzimi dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle elde edilebilir (Susanto ve diğ. 2021). Çoğu protein biyoaktif parçalar içermesine rağmen ana protein olmadan aktif olmamaktadır. Aktif peptitin bir kısmı doğal proteinden sadece proteolitik sindirim yoluyla elde edilmiştir; bu bileşenler pepsin, tripsin, kimotripsin, elastaz ve karboksipeptidler gibi enzimlerin etkisine dayanabilmektedir.



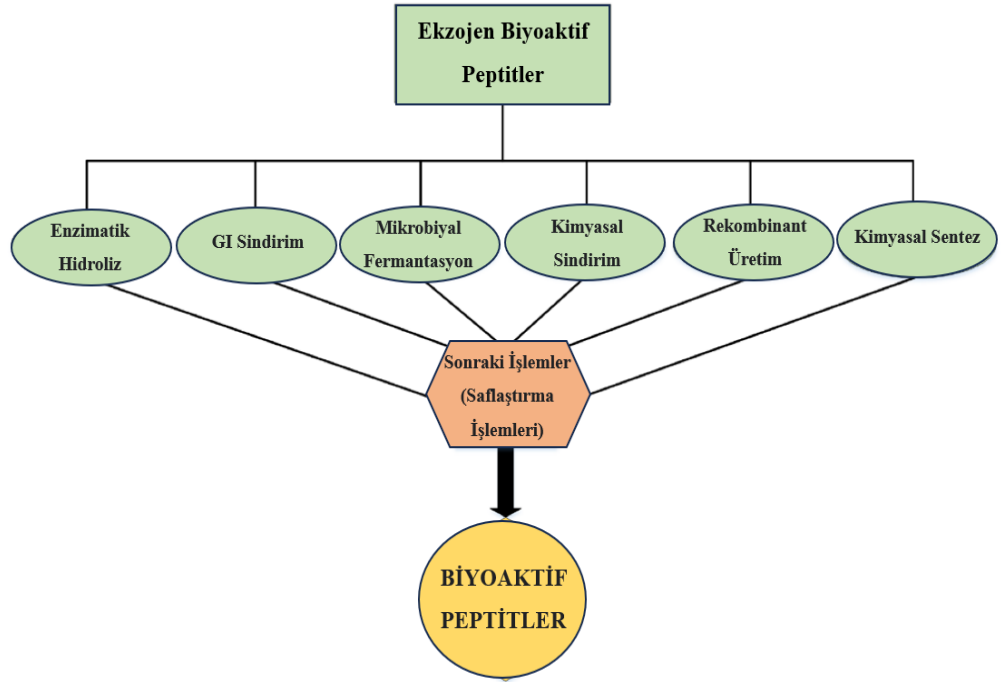
Şekil 3.1: Biyoaktif peptit elde edilme ve belirlenme aşamaları (Susanto ve diğ. 2021).

Biyoaktif peptitler endojen ya da eksojen halde bulunabilmektedir. Organizmada proteolitik enzimlerin aktivitesi sonucu oluşan peptitlere Endojen peptitler denmektedir. Endojen peptitler, diğer proteinler çöktürülerek çözünür fazdan elde edilebilmektedir. Eksojen peptitler, aktivite göstermeden protein zinciri içerisinde yer almaktadır. Eksojen peptitlerin aktivite göstermesi için in vitro şartlarda bulunan protein zincirinin parçalanarak peptitlerin açığa çıkartılması gerekmektedir. Eksojen peptitleri aktifleştirmek için üç yöntem kullanılabilir:

- Sindirim enzimleri kullanılarak yapılan enzimatik hidroliz yoluyla,
- Mikrobiyal fermantasyon ile,

- Proteolitik enzimler (mikroorganizmalardan elde edilmiş) kullanılarak (Akhmadeeva 2018).

Bu aktivasyon normal koşullarda sindirim sisteminde besinlerin parçalanması sonucu gerçekleşmektedir. Aktivasyonda kullanılacak enzimler: alkalaz, kimotripsin, tripsin, pankreatin, nötraz, termolizin, pepsin vb. örnek verilebilir. Bu enzimler bitkisel, hayvansal ya da bakteriyel kaynaklı olabilmektedir. Aynı kaynak kullanılarak farklı enzimlerle farklı peptitler elde edilebileceği gibi aynı enzimle farklı kaynaklardan farklı peptitler elde etmek de mümkündür. Araştırmacının inceleme amacına göre seçim yapılarak laboratuvarında ortaya çıkarılan peptitler sentezlenebilmektedir. Peptitlerin sentezlenmesi için kullanılacak yöntemler Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

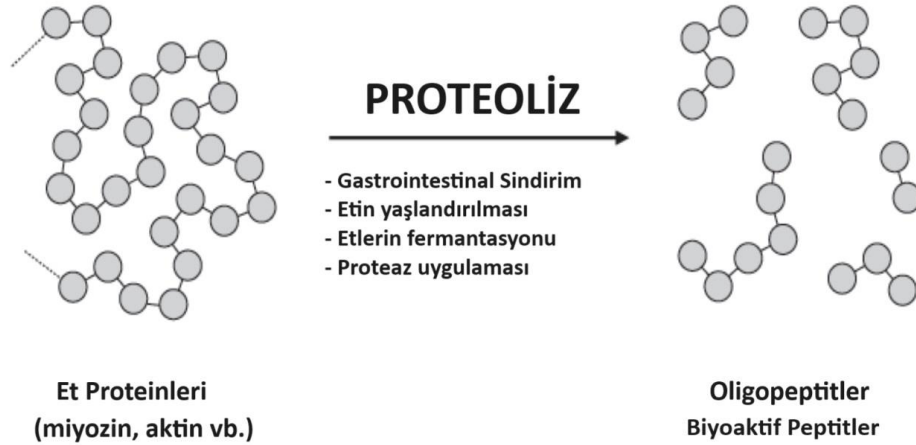


Şekil 3.2: Biyoaktif peptit üretim yöntemleri (Akbarian ve diğ. 2022)

Biyolojik aktif peptit elde edilmesinde verilen yöntemlerden seçim yapılırken dikkat edilecek husus peptitlerin endojen ya da ekzojen olmasına göre karar verilmesidir. Yapılacak analizde kullanılacak enzim türü, kimyasallar, sıcaklık, süre gibi değişkenlerin belirlenmesinde, en önemlisi peptitlerin aktivasyonunun sağlanarak dizilimlerinin belirlenmesi işlemlerinde doğru sonuca ulaşmak için bu duruma dikkat edilmesi oldukça önemlidir.

Eksojen biyoaktif peptit elde edilmesi işlemi proteinlerin in vitro koşullar sağlanarak proteazlar ile hidrolizi sonucunda biyoaktif özelliklere sahip peptit fragmanlarının elde edilmesine dayanmaktadır. Peptitler yapılarındaki aminoasit karakterine göre farklı özellikler göstermesi itibariyle ekstraksiyonlarında ve analiz parametrelerindeki değişimler göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple analiz yapılırken dikkat edilecek hususlar şu şekilde sıralanabilir: peptitlerin; endojen/ eksojen olma özellikleri, çözünürlük, pH, molekül kütleleri, fragmentasyon, stabilite, iyonizasyon gibi fizikokimyasal karakterleri. Bu özelliklere göre ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri de değişiklik göstermektedir.

Biyoaktif peptitleri üretmenin en yaygın yöntemi sindirim enzimleri ile enzimatik hidroliz sayılabilir. Protein hidrolizi, proteinde enzimatik hidroliz veya kimyasal hidroliz kullanılarak protein moleküllerinin parçalanması ve daha küçük peptit dizilerinin ve nihayetinde amino asitlerin elde edilmesi sürecidir (Akhmadeeva 2018). Bu yöntemde proteine belirli bir pH ve sıcaklıkta enzimatik işlem uygulanarak farklı biyolojik aktiviteleri olan peptitler ortaya çıkarılabilmektedir (Chakrabati ve diğ. 2014). Proteazlar, peptit bağlarının hidrolizini katalize etmektedirler. **Şekil 3.3**'te enzimatik hidroliz örnek gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.3: Enzimatik hidroliz gösterimi (Susanto ve diğ. 2021)

Çoğu biyoaktif peptitlerin salınımında pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi gastrointestinal enzimler kullanılmaktadır (Barberis ve diğ. 2018). Bu yöntemin en yaygın ve güvenilir yöntem olarak görülmesi, bahsedilen enzimlerin mikrobiyal fermentasyona göre daha hızlı tepkimeye girerek daha kısa reaksiyon süresine sahip olmasıdır. Kullanılan diğer enzimler ise, kimotripsin, alkalaz, termolisin, pankreatin

olarak örneklendirilebilir (Sultan ve diğ. 2018). Bu enzimlerle oluşturulan reaksiyon sonucunda diğ er peptitlerle karışık halde bulunan biyoaktif peptitler mikrofiltrasyon, nanofiltrasyon ve ultrafiltrasyon yöntemleri kullanılarak saflaştırılmaktadır (Edebali ve diğ. 2020).

Biyoaktif peptit üretme yöntemlerinden diğ eri olan mikrobiyal fermantasyon, bakteri veya mayaların protein substratları üzerinde kültürlenmesi ve onlar büyüdükçe enzimleriyle proteinleri hidrolize etmelerini içermektedir (Daliri ve diğ. 2017). Bakteri/ mayaların büyümesi için uygun sıcaklık ortamı oluşturulmaktadır. Büyüyen bakteri/ mayalar ana proteindeki peptitleri serbest bırakmak için proteolitik enzimlerini salgılamaktadır. Daha sonra hücreler hasat edilmekte, yıkanmakta ve steril damıtılmış suda süspansiyon edilmektedir. Böylece sterilize edilmiş bir protein substratını aşılama için başlatıcı olarak kullanılmaktadır.

Sindirim/Mikrobiyal Enzimleri ile Gastrointestinal Sindirim ise yine biyoaktif peptit üretme yöntemlerindedir. Biyoaktif peptitler, mide ve pankreas proteazları, yüzey proteazları ve sitozolik plazma tarafından sindirilebilirler yani biyoaktif peptitler gastrointestinal sistemde protein sindirimi sırasında ortaya çıkarılabilmektedir. Mideye gelen besin proteinleri denatüre olmakta, hidroklorik asit pepsin etkisiyle kısmen parçalanarak biyoaktif peptitler ortaya çıkmaktadır.

Biyoaktif peptit üretme yöntemlerinden biri seçilip, uygulanıp saflaştırma işlemine gelindiğinde ise en yaygın yöntemler şu şekildedir: yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve kapilar elektroforez. Saflaştırma işlemi sonrası, peptitlerin yapı analizleri genel olarak kütle spektrometresi (LC-MS/MS, ESI-MS, MALDI-MS) ile yapılmaktadır. Kütle spektrofotometresindeki farklı yöntemler, yüksek hassasiyet ve çözünürlük ile peptit kimyasal yapı tayininde ayrıca peptitin moleküler kütle yüklenme oranı belirlenirken doğru sonuçlara ulaşmak amacıyla bulunmaktadır (Sewald and Jakubke, 2015). Bu seçimi yapmak araştırmacının amacına ve ulaşmak istediği sonuca göre değişkenlik gösterebilmektedir.

3.5 Etteki Biyoaktif Peptit Türleri

Etteki biyoaktif peptitler şunlardan oluşur: histidil dipeptitler, L-karnitin, peptitler gibi taurin bileşenleri, ACE inhibitörü, antioksidatif peptitler, peptit prebiyotik ve diğer umut verici peptitler.

3.5.1 Histidil dipeptitler

Histidil dipeptitlerin bulunma oranı hayvan türleri arasında farklılık göstermektedir. Etteki endojen antioksidanları belirlemek için çalışma yapılmış ve etteki antioksidanlardan bazıları şu şekilde verilmiştir: tokoferol, ubiquinon, karotenoidler, askorbik asit, glutatyon, lipoik asit, üreik asit, spermin, karnozin, anserin (Decker ve diğ. 2000).

Karnozin (β -Alanil-L-histidin) ve anserin (N- β -Alanil-1-metil-L-histidin) gibi histidil dipeptit bileşikleride ette en fazla bulunan antioksidanlardır. Tavuk but etindeki karnozin konsantrasyonu kg başına 500 mg ve domuz etinde kg başına 2700 mg'dır. Anserin tavuk etinden elde edilir. Bu bileşiklerin her ikisi de bakır gibi bir geçiş metaline bağlanma yeteneği ile ilgili antioksidanlar olarak hareket eder (Arihara ve diğ. 2008). Ette doğal olarak bulunan antioksidan peptit bileşikleride: glutatyon, karnozin, anserin ve ophidinedir (Samaranayaka ve diğ. 2011; Susanto ve diğ. 2021).

3.5.2 L-Karnitin

Shimada ve diğ. (2005), yaptıkları çalışmada çeşitli hayvanların iskelet kaslarında birçok L-Karnitin (β -hidroksi-trimetil gama-amino bütirik asit) tespit etmişlerdir. Sığır butunda bulunan L-Karnitin içeriğini kg başına 1300 mg olarak bulmuşlardır. Bu bileşik insan vücudunun enerji üretmesine ve kolesterol seviyelerini düşürmesine yardımcı olarak, vücudun kalsiyumu emmesine, kemik gücünü ve kromu artırmasına yardımcı olmaktadır.

3.5.3 Diğer biyoaktif bileşenler

Etteki diğ er biyoaktif bileş enler, toksikolojide ve patolojik hü cre süreçlerinde antioksidan işlevi olan glutatyondur. Jones ve diğ. (2005), yaptıkları çalışmada kırmızı etin, 12,0-26,0 mg /100 g sığı r eti ile glutasyon kaynaklarından biri olduğ unu bildirmiştir. Taurin, bağ ışıklık için emzirmenin yanı sıra vü cudu oksidatif streten korumak için gerekli olan bir amino asittir. Et; 77,0 mg/ 100g sığı r eti ile taurin kaynaklarından biridir (Purchas ve diğ. 2004). Koenzim Q10 (ubikinon) da antioksidan aktivite gösteren diğ er biyoaktif bileşiklerden biridir ve 2 mg/100 g olarak sığı r etinde bulunmaktadır. Ayrıca kas enerjisi metabolizmasında önemli bir role sahip olan kreatin ve kreatin fosfat bileşiğ i de bu bileşiklerden bazılarıdır. Sığı r eti 350 mg/100 g kreatin iç ermektedir (Purchas ve diğ. 2005; Susanto ve diğ. 2021).

3.6 Biyoaktif Peptitlerin Güvenliğ i

Biyoaktif peptitlerin “Fonksiyonel Besinler” veya “Nutrasötikler” olarak pazarlanan birçok ü rü nü n temel bileş enini oluşturduğ u bilinmektedir. Normal üretim işleminin değ iştirilmesiyle bu ü rü nlerdeki biyoaktif peptitler zenginleştirilmektedir. Güvenlik açısından dü řü nü ldü ğ ü nde ise genel olarak gıda proteinlerinden türetilen biyoaktif peptitlerin güvenliğ i konusunda çok az endişe vardır. ü nkü vü cut normalde gıda proteinlerini peptitlere ve enzimlere hidrolize etmekte ve biyoaktif peptitler ü retmek için işlemlerden geçirmektedir.

Biyoaktif peptitlerin çok yü ksek dozda tüketilmesi veya kullanılması durumunda olası yan etki riskleri bulunmaktadır. Ayrıca protein hidrolizatlarında immü nojenik proteinlerin ve peptitlerin varlığ ı sebebiyle bazı bireylerde alerjik reaksiyonları azaltan ve/veya arttıran etkileri söz konusu olabilmektedir (Chakrabarti ve diğ. 2018).

Birçok çalışma, hü cre kù ltürlerindeki biyoaktif peptitlerin toksik olmadığ ını bildirmiştir (Udenigwe ve Aluko, 2012). Phelan ve diğ. (2009) tarafından sü tten elde edilen peptitlerin güvenliğ i konusu araştırılmıştır. Peptitlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli büyük olmasına rađ men, tüm gıda uygulamaları için uygun olmayabilmekte ve bu bileşiklerin güvenliğ inin ve toksisitesinin kontrol edilmesi gerekmektedir.

Kozmesötik ürünlere yönelik artan talep, biyoaktif peptitlere dayalı yeni nesil ürünlerin geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır. Bu nedenle, kozmetik peptitlerin özellikle etkinlik açısından güvenlik değerlendirmesi ciddi bir şekilde ele alınmalıdır. Güvenli ve etkili miktarın, bir bileşimin veya bileşiğin önemli olumlu cilt faydaları üretmek için yeterli olan ancak cilt toksisitesi, hassaslaşma ve tahriş gibi istenmeyen etkilerden kaçınmak için yeterince küçük olan miktarı olduğu belirtilmiştir (Osborne ve diğ. 2018, Ngoc ve diğ. 2023).

4. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

4.1 Kokoreç ile İlgili Literatür Araştırması

4.1.1 Kokorecin Mikrobiyolojik Olarak İncelenmesi

Temelli ve diğ. (2002), Bursa'daki üretim yerlerinden 10 çiğ, 10 pişirilmiş ve 10 pişirildikten sonra baharatlanmış 30 adet kokoreç numunesini mikrobiyolojik yönden 10 farklı parametreye bakarak incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda bağırsakların hassas bir şekilde temizlenmediği, mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduğu, patojen bakteriler içerdiği ve pişirme işleminde uygulanan ısı işleminin yetersiz olduğu tespit edilmiştir.

Bilgin ve diğ. (2008), yaptıkları araştırmada 20 çiğ, 20 ızgara ve 20 tandırda pişirilmiş 60 adet kokoreç numunesi toplayarak mikrobiyolojik özelliklerini incelemiştir. İncelemede mezofil aerob bakteri, koliform grubu bakteri ve *S. aureus* sayıları bulunarak 3 farklı örnek arasında kıyaslama yapılmıştır. Analiz sonucunda pişirme yöntemlerinin patojen giderme işlemi için yetersiz olduğu fakat ızgarada pişirme yönteminin tandırda pişirmeye göre mikrobiyolojik açıdan daha etkin olduğu görülmüştür. Burada dikkat edilmesi gereken husus güvenli tüketim için pişirmede uygulanan sıcaklık ve süre değerlerinin uygunluğunun gözetilmesidir

Kara ve diğ. (2013), Afyonkarahisar'da tüketiciye sunulan kokoreçlerden 50 adet kokoreç numunesi toplayarak bunların mikrobiyolojik kalitesini belirlemeyi amaçlamıştır. Numuneleri 9 farklı yönden (TAMB, TAPB, Küf/maya gibi) ele alarak mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirmiştir. Analiz sonucunda kokoreç numunelerinin düşük kalitede olduğu, istenmeyen mikroorganizmalarla kontamine olarak sağlık açısından risk oluşturabileceği kanısına varmıştır.

Babaoğlu ve diğ. (2017), sığır ve kuzu kokoreçte polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) oluşumunda farklı hayvansal yağların etkilerini incelemişlerdir. Dana ve kuzu ince bağırsakları ile kuzu don yağı, kuzu deri altı yağı ve kuzu kuyruk yağı kullanılarak 6 farklı türde kokoreç grubu hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon ve temizleme işlemleri, HPLC analizi, pH analizi ve istatistiksel analizler sonucunda 6 farklı örnek karşılaştırılmıştır. Kokorecin PAH'ların varlığı nedeniyle riskli besin grupları arasında yer aldığı belirlenmiştir. PAH konsantrasyonları incelendiğinde 6 kokoreç grubunun da önemli ölçüde farklılık gösterdiği görülmüştür. En yüksek PAH konsantrasyonları sığır kokoreci ve kuyruk yağı ikilisinde görülmüştür. En düşük ise kuzu kokoreci ve kuyruk yağı ikilisinde tespit edilmiştir.

Akgöl ve diğ. (2023), 3 farklı lokantadan aldıkları 48 pişmiş baharatsız, 48 pişmiş baharatlı kokoreç numunesini mikrobiyolojik olarak incelemişlerdir. İncelemeler göz önüne alındığında bağırsakların çok iyi temizlenmediği, ısı işlemlerin yetersiz kaldığı ve halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

4.2 Biyoaktif Peptitlerle İlgili Literatür Araştırması

Akhmadeeva (2018), bal arısı larvası kullanarak biyoaktif peptit eldesi ve incelenmesi çalışması yapmıştır. Araştırmada bal arısı larvası kullanılmasının nedeni inflamasyon, bağışıklık sistemi hastalıkları hatta kanser gibi birçok hastalıkta koruyucu ve tedavi etkisi olduğunun bilinmesidir. Peptit hidrolizatlarının elde edilmesi amacıyla homojenize edilen larvaların tripsin ve nötraz enzimleriyle hidroliz etkinlikleri belirlenmiştir. Elde edilen hidrolizatlarının α -glukozidaz, ACE enzimleri inhibisyonu ve antioksidan etkileri üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak 3kDa↓ nötraz ve tripsin hidrolizatları biyolojik aktivite çeşitliliği açısından incelenerek daha etkin olduğu bulgusu ortaya çıkarılmıştır.

Rezaharsanto ve Subroto (2019), çeşitli et kaynaklarından türetilen biyoaktif peptitlerin incelenmesi üzerine çalışmışlardır. Peptitlerin antimikrobiyal, antihipertansif vb. özellikleri açıklanarak büyükbaş ve küçükbaş hayvan, kümes hayvanları ve domuz eti gibi birçok hayvan türünden biyoaktif peptit elde edilebileceği vurgulanmıştır. Biyoaktif peptitleri üretmek için enzim hidrolizi, mikrobiyal fermantasyon, asit-baz hidrolizi ve izoelektrik çözünme/çöktürme gibi yöntemlerin kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Susanto ve diğ. (2021), ette biyoaktif peptit sentezlenmesi, ekstraksiyonu ve tanımlanmasını sağlamak ve süreci anlamlandırmak için sistematik bir inceleme yapmışlardır. Etteki biyoaktif bileşiklerin türleri ve sentezi konularına açıklık getirilmiş; biyoaktif bileşiklerin tanımlanması için gerekli HPLC, LC-MS/MS yöntemlerinden faydalanarak peptit türleri tanımlanmıştır. İncelenen sarkoplazmik kas proteinlerinden 170'ten fazla peptidin ortaya çıktığı saptanmıştır. Salınan peptitlerden bazılarının antihipertansif bileşikler veya antioksidanlar olarak aminoasit dizisi potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

Ekberyana ve diğ. (2022), biyoaktif peptitlerin çeşitli üretim yöntemlerini (Enzimatik Hidroliz, Mikrobiyal fermantasyon vb.) ve kaynaklarını (su ürünleri kaynakları, süt ürünleri vb.) incelemiştir. Proteomik ve peptidomik çalışmalar gibi bilgisayar tabanlı yöntemlerin peptitleri araştırmada çok faydalı olduğu, bu yöntemlerle üretilen peptitlerin ikincil yapılarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelenmesinin de mümkün olacağı hakkında gelecek perspektifleri sunulmuştur.

Madhu ve diğ. (2022), yaptıkları çalışmayla biyoaktif peptitlerin üretiminde karşılaşılan zorluklar ve ticarileştirilmelerini sınırlayan faktörlere değinmiştir. Ayrıca biyoaktif peptit üretiminde oluşabilecek toksik peptitler hakkında da açıklamalarda bulunarak güvenlik ve risk tanımlamalarına yer verilmiştir. Çalışmaya göre; tek tip kalite, yüksek maliyet, toksikolojik çalışmaların ve klinik kanıtların yetersizliği ve biyoyararlanım verilerinin eksikliği biyoaktif peptit bazlı gıdaların ticari ilerlemesini engelleyen bazı zorluklardır. Buna ek olarak ülkeler arası mevzuat farklılıkları, biyoaktif peptitlerin uluslararası ticaretinde zorluk teşkil etmektedir.

4.2.1 Farklı Et Ürünlerinde Biyoaktif Peptit İncelenmesi

Song ve diğ. (2019), Maillard reaksiyonunun yarım süzgeçli hamsi hidrolizatı türevi peptitlerinin antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. F3 peptidik fraksiyonundan seksen iki peptit tanımlanmış ve dizilerdeki W, F, Y, K, H ve R kalıntılarının varlığına göre beş gruba ayrılmıştır. Sentetik peptitlerin Maillard Reaksiyon ürünlerinde antibakteriyel aktivite ve glikozilasyon içeriklerinde artışlar bulunmuştur. Elde edilen bulgular Maillard Reaksiyonunun hidrolizat türevi

peptitlerin antibakteriyel aktivitesinin artışına katkısı olduğu hakkında fikir vermektedir.

4.2.2 Biyoaktif Peptitlerin Kullanım Alanları

Yergöz (2017), yanık yaralanmaların dünya genelinde en yaygın travma tiplerinden biri olduğunu vurgulayarak yanık yaralanmalarının kendine özgü fizyolojisi, tedavisi için kendine özgü terapötik materyallerin kullanılmasını gerektirdiği için tedavisinin geliştirilmesinde zorluğa sebep olduğunu belirtmektedir. Çalışmada yanık yara alanında oluşan ilerleyici doku fonksiyonu kaybının hafifletilerek iyileştirilmesi amacıyla sentetik, fonksiyonel ve biyolojik olarak parçalanabilir peptit nanofiber jel kullanımı önerilmektedir.

Ngoc ve diğ. (2023), biyoaktif peptitlerin cilt sağlığı ve güzelliğini artırma potansiyeli olması nedeniyle kozmetik sektöründe büyük ilgi görmesi üzerinde çalışma yapmıştır. Biyoaktif peptitlerin çeşitli biyolojik aktiviteleri incelenerek kozmetik formülasyonlar için ideal bileşenler haline getirmek amaçlanmıştır. Biyoaktif peptitler 4 kategoride sınıflandırılmıştır: sinyal, taşıyıcı, nörotransmitter inhibe edici ve enzim inhibe edici peptitler. Biyoaktif peptitlerin doğada bulunma kaynaklarına ve bu kaynaklardan elde edilme yollarına değinilmiştir. Sonuç olarak da peptitlerin kozmetikteki uygulamalarının kapsamlı şekilde anlaşılmasını sağlayarak yenilikçi ve etkili cilt bakım ürünlerinin geliştirilmesi yoluna ışık tutmaktadır.

Pedrouso ve diğ. (2023), çalışmalarında çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanarak biyoaktif peptitlerin tanımlamışlar; et ve yan ürünlerinden elde edilen peptitlerin biyoaktif özelliklerini açıklamışlardır. Ayrıca peptitlerin gıda sektöründe potansiyel uygulama alanlarından, üretilirken karşılaşılan zorluklar ve sınırlamalardan da bahsedilmiştir.

4.2.3 Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığına Yararları

Milano ve diğ. (2014), etten elde edilen biyoaktif peptitlerin oluşumu ve bunların insan sağlığına etkilerini incelemişlerdir. Biyoaktif peptitlerin et de dahil olmak üzere bitkisel ve hayvansal gıdalardan elde edilebileceğini ve bu peptitlerin

gastrointestinal sindirimde veya gıda işleme sırasında salındıktan sonra insan vücudu üzerinde antioksidatif, antimikrobiyal, antitrombotik, sitomodülatör olmak üzere birçok farklı etki yaptığı saptanmıştır. Bu peptitlerin özellikle sentetik ilaçlara kıyasla sahip olduğu avantajlara değinerek sağlığın artırılması ve hastalık risklerinin azaltılması amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir.

Ünal ve diğ. (2018), biyoaktif peptitlerin, sindirim, endokrin, kardiyovasküler, bağışıklık ve sinir sistemini yani insan sağlığını etkilediğini öne sürmüşlerdir. In vitro ve in vivo çalışmalarda bulunularak biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal, antihipertansif, kolesterol düşürücü, gibi birçok özellik gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca peptitlerin antikanserojen etkileri çeşitli kanser hücreleri ve hayvan hücrelerinde araştırılmıştır.

Yalçın ve Rakıcıoğlu (2020), yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarla biyoaktif peptitlerde antihipertansif, hipolipidemik, antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu aktivitelere sahip olmasının yanında biyoaktif besin peptitlerinin güvenilirliği hakkında da inceleme ve yorumlarda bulunmuşlardır.

Rizwani ve diğ. (2023), biyoaktif peptitlerin antikanserojen, antihipertansif, antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik ve immün modülatör etkilere sahip olması sebebiyle sağlığı geliştirici ve destekleyici özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Biyolojik olarak aktif peptitlerin yeni nesil farmasötik ürün olarak kullanılmaya başlanma potansiyeline sahip olması özelliğiyle COVID-19 dahil çeşitli hastalıklar için umut verici olarak bahsedilmektedir. Daha fazla in vitro ve in vivo çalışma yapılarak COVID-19 hastalarının hayatta kalma ve yaşama şansını arttırmadaki etkinliği ortaya konabileceği vurgulanmıştır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1 Materyal

5.1.1 Kokoreç Örneği

Çalışmada Denizli'deki bir kokoreç üretim tesisinden koyun bağırsaklarının omentum (gömlek yağı) ve mezenteriyum (çöz yağı) ile sarılması sonrasında endüstriyel fırınlarda 200-220°C'de ısıl işleme tabi tutulması ile birinci pişirilmesi yapılmış kuzu kokoreci alınarak incelenmiştir.

5.1.2 Alet Ekipman Tanımları

- şişe sarılmış 1.Ön pişirimi yapılmış kokoreç (1 Kg)
- Pudralı eldiven (2 Kutu)
- Selüloz kartuş (1 Kutu)
- Parafilm (100 mm genişlikte, en az 35 metre uzunlukta)
- Santrifüj tüpü (50 ml lik falkon tüpü-2 Paket)
- Stomacher Poşeti (50 adet/paket)
- Kaba filtre kâğıdı (40*40 cm, 250 adet/paket)
- şıringa filtresi 0,22 µm, steril (2 Paket)
- şıringa filtresi 0,45 µm, steril (2 Paket)
- 50 cc enjektör (1 Paket)
- Petri kutusu, polistiren, steril (2 Koli)
- Pipet ucu (200 µL'lik) (2 Paket)
- Spektrofotometre küveti, PS, köpük rakta, 2-4 ml makro (100 adet/paket)
- Spektrofotometre küvetleri için stant(1 adet)
- Tartım kabı (10 ml, beyaz, non-steril, elipsoidal formlu, plastik, 100 adet/1 paket)
- Microsampler mikrolitre şıringa 100ul (HPLC uyumlu, cam)

- Kinetex 5u EVO C18 100A 150x4.6mm kolonu

5.1.3 Kullanılan Kimyasallar

- Pepsin enzimi (1 g/paket)
- Tripsin enzimi (sığır pankreasından) (1 g/paket)
- Methanol (2.5 Litre)
- Sodyum hidroksit (CAS No: 1310-73-2)(1 L)
- Hidroklorik asit (CAS No: 7647-01-0) (500 ml)
- Ethanol (2.5 Litre)

5.2 Metot

5.2.1 Kokoreç Örneklerinden Peptitlerin Ekstraksiyonu

Bağırsaktan peptid ekstraksiyonu Badii ve Howell (2006) ve Sarbon ve diğ. (2013) tarafından açıklanan yöntemle göre yapılmıştır. Örnek yıkama ve 1. pişirme aşamasından geçirildiği için yıkama yapılmamıştır. İncelenecek her örnek için (analizlerde paralel gitmek amacıyla) 0,5 g kokoreç örneği alınıp iyice kıyılarak homojenize edilmiştir. Preparat, sodyum hidroksit (%0,15 w/v), sülfirik asit (%0,15 v/v) ve sitrik asit (%0,7, w/v) çözeltileri ile ön uygulamaya tabi tutulmuş ve Stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Her karışım 20 dk boyunca karıştırılarak 8.000 devirde santrifüjlenmiş, kalan pellete karıştırma ve santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Örnekler daha sonra 45°C'de çalkalamalı su banyosuna alınarak 12 s boyunca bekletilmiştir. Su banyosundan alınan karışım, Bühner hunisinden Whatman no.4 filtre kâğıdı ile süzülüp 45°C'de vakum altında çözeltinin buharlaştırılması amacıyla evapore edilmiştir. Elde edilen konsantrat dondurularak kurutulmuş ve kuru materyal enzimatik hidrolize geçmeden önce "kokoreç tozu" olarak elde edilmiştir.

5.2.2 Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz Gathercole ve diğ. (2023), yaptığı çalışmada *in vitro* ortamda gastrointestinal sindirim metot alınarak yapılmıştır. Yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen kokoreç tozu, deiyonize su (10 mL) ile solüsyon haline getirilmiş (%1, w/v), 1 M HCl ile pH değeri 2'ye ayarlanmıştır. Uygun ortamda pepsin enzimi kullanılarak enzim/substrat oranı 1:10 (w/w) olacak şekilde hidrolize edilmiştir. Sindirimin tamamlanması ve enzimin aktivasyonunun sağlanması için örnekler çalkalamalı su banyosunda (C7-New Brunswick Scientific, ABD) 24 sa boyunca bekletilmiştir. Beklemesi tamamlanan hidrolizat 15 dk boyunca 95°C'de su banyosunda bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Ardından 8.000 devirde 10 dk santrifüj uygulanarak üst faz elde edilmiştir.

5.2.3 HPLC ile Fraksiyonların Toplanması

HPLC analizi için Timofeeva ve diğ. (2017) ve Doyuk ve Dost (2023) metotları kullanılmıştır. Enzimatik Hidroliz sonucu elde edilen hidrolizat kurutularak ve lipit fraksiyonlarının elde edilmesi amacıyla 100 mg/ml asetat tamponu içerisinde (0,02 M ve pH=4) çözündürülüp, ardından sırasıyla 0,45 ve 0,22 µm'lik filtrelerden süzölmüştür. Daha sonra Sephadex C-25 katyon değışim kromatografisi (Pharmacia Biotech, İsveç) uygulanarak ayrılan fraksiyonlar toplanmıştır.

Her ekstraktan 5 mL alınarak, Sephadex sabit fazı ile doldurulmuş bir kolona (4.6x250mm) enjekte edilmiştir. (4 °C'de 0,01 N HCl ile 15 mL/h' lik sabit bir akış hızında) ve 5 mL'lik fraksiyonlar 214, 254 ve 280 nm'de izlenerek toplanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar liyofilize edilerek ve 2 mL saf suda çözümlenerek bir sonraki analize kadar -20 °C'de saklanmıştır. Ardından HPLC-DAD sistemi yapılarak gerçekleştirilecek olan aminoasit analizi için 3 adet örnek ürün Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Araş. Merkezi'ne gönderilmiştir.

5.2.4 HPLC-DAD ile Aminoasit Analizi

Perfüzyon kültüründe en uygun amino asit konsantrasyonunun belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle, bir amino asit takviyesi stratejisinin tasarımı, konak hücre büyümesi ve ürün üretimi nedeniyle bir hücre kültürünün amino asit taleplerini belirleyerek kolaylaştırılabilir. Biyoprosesler sırasında amino asitlerin rollerinin incelenmesi, besleme stratejisinin daha iyi anlaşılmasına ve ürünün verim ve kalitesinin iyileştirilmesine yol açmaktadır.

Amino asitlerin analizi için yaygın olarak HPLC yöntemi kullanılmaktadır. UV veya floresan saptamalı HPLC ayırmaları için çözeltideki serbest amino asitlerin ön kolon türevlendirmesi, çevrimdışı yöntemlere kıyasla verimliliği artırabilmektedir. Kolonunun ve mobil faz gradyanının seçicilik özellikleri 23 amino asidin çözünürlüğünü ve tespit edilmesini sağlamaktadır (AdvancedBio, 2023).

HPLC ile fraksiyonların toplanması ve ayrıştırma işlemi yapılırken HPLC-DAD ile numune içeriğinde bulunan aktif aminoasitlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. DAD dedektörü, ayrılan bileşen konsantrasyonu ile bağlantılı bir sinyal üretmektedir. Bu sayede önceki bölümde ayrıştırılan bileşenler ölçülerek bir dizi analiz sistemine tabi tutulmaktadır.



Şekil 5.1: HPLC-DAD Cihazı

Aminoasit Analizinin yapılmasında izlenen adımlar aşağıda verilmiştir:

- HPLC mobil fazlarının hazırlanması,
- Amino asit standartlarının hazırlanması,
- Dahili Standart (ISTD) stok çözeltisinin hazırlanması,

- Çevrimiçi türevlendirmenin gerçekleştirilmesi,
- Algılama için parametrelerin ayarlanması,
- Yüksek verimli rutin analizlerinin çalıştırılması,
- Avrupa'ya göre sistemin uygunluğunun sağlanması,
- Hücre kültürü ortamının ve protein hidrolizat standardının optimize edilmesi.

Numuneler filtreden geçirildikten sonra direk olarak cihaza enjekte edilmiştir. 2 çeşit reaktif (OPA ve FMOC) kullanılarak **Tablo 5.1**'de verilen cihaz metodu uygulanmıştır.

Tablo 5.1: HPLC cihaz metodu
HPLC Agilent 1260 Infinity II

Mobil Faz A:	40 mM Borat Tamponu pH:7,8
Mobil Faz B:	ACN: MeOH: water (45:45:10, v/v/v)
Fırın Sıcaklığı:	40°C
İzlenen Dalgaboyu:	338 nm
Akış:	2 mL/dk
Duruş Zamanı:	26 dk
Enjeksiyon Hacmi:	20 µL

Gradient Tablosu Agilent Eclipse AAA (150 mm kolon için) cihazda 2 farklı Mobil Faz akışını zamana göre gösteren **Tablo 5.2** aşağıda verilmiştir.

Tablo 5.2: HPLC zamana göre mobil faz akışı

Süre (dak)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
1.9	100	0
18	43	57
18.6	0	100
22.3	0	100
23.2	100	0
26	100	0

5.2.5 LC/Q-TOF /MS ile Biyoaktif Peptit Diziliminin Belirlenmesi

LC/MS, sıvı kromatografi ile kütle spektrometresinin fiziksel ayırma ve kütle analiz özelliklerinin kombinasyonundan oluşmuş sistemlerdir. Q-TOF LC/MS (Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi), ise kantitatif ve kalitatif analizler için yüksek hız ve duyarlılıkta ölçümler yapabilmektedir.



Şekil 5.2: Agilent 6550 QTOF LC/MS cihazı

İzmir Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Araş. Merkezi'nde mevcut olan Agilent 6550 QTOF LC/MS cihazı proteomik ve metabolomik çalışmalarda kullanılabilir. Kullanılan cihaz resmi **Şekil 5.2**'de gösterildiği gibidir.

LC/Q-TOF/MS ile; Farmakoloji, Gıda Güvenliği, Çevresel Uygulamalar, Toksikoloji ve Adli Tıp alanlarında uygulama yapılabilir. **Tablo 5.3**'te LC/Q-TOF/MS için kullanılan cihazın özellikleri gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde cihazın tarama hızı ve çözünürlük konusunda yüksek özelliklere sahip olduğu söylenebilir.

Tablo 5.3: Cihaz donanım ve özellikleri (Ege Matal, 12.01.2024'te erişildi)

Duyarlık:	Femtogram Düzeyinde
Çözünürlük:	40 k (Ion Beam Compression and Shaping (IBCS))
Kütle Ağırlığı:	m/z 20-100000
Tarama Hızı:	50 spektrum/dakikaya
İyon Kaynakları:	Dual sprey atmosferik elektrosprey iyonizasyon (ESI), Atmosferik basınç foto iyonizasyon (APPI), Atmosferik

	basınç kimyasal iyonizasyon (APCI)
Yazılım:	Mass Hunter Workstation Software
LC Cihazı:	Agilent 1260 Binary LC (Gerektiğinde nanoLC cihazı olarak kullanılabilir).

5.2.6 Biyoaktif Peptit Veritabanları ile Peptitlerin Tanımlanması

Peptit biyoaktivitelerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan pek çok veritabanı bulunmaktadır. Bu veri tabanları peptit dizilimlerinin yanı sıra biyoaktiviteleri ve belirlendiği çalışmalarla ilgili detayları içermektedir. Biyoaktif peptitlerle ilgili genel arama yapılabilecek veritabanlarına;

- UniProt-Peptide Search (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>),
- PepBank (<http://pepbank.mgh.harvard.edu/search/basic>),
- EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/>),
- PeptideAtlas
(https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/Search?_tab=1)
örnek verilebilir.

Gıda kökenli biyoaktif peptitler için özelleştirilmiş veri tabanları ve ayrıca proteinin biyoaktivite profilinin tahmin edilebildiği platformlara da BIOPEP-UWM™ (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) ve FeptideDB (http://www4g.biotech.or.th/FeptideDB/enzyme_digestion.php) örnek verilebilir.

Çalışmada ise Peptitlerin tanımlanmasında LC/Q-TOF/MS analizinde elde edilen peptit dizilimleri BIOPEP-UWM (Profiles of Proteins Potential Biological Activity) veritabanı vasıtasıyla işlenerek peptitlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Bilimsel çalışmalar sonucunda tanımlanan peptit dizilimlerinin sayısı arttıkça bu dizilimlerin daha önce tanımlanan dizilimlerle karşılaştırılması olası eksikliklerin zaman içinde giderilerek sürekli iyileştirilmesini sağlamaktadır.

5.2.7 DPPH Radikali ile Antioksidan Aktivite İncelemesi

Bazı amino asitlerin varlığı ve peptit dizisindeki konumları, peptitlerin antioksidan aktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Aluko 2015). Tirozin (Y),

histidin (H), triptofan (W) ve fenilalanin (F) gibi aromatik amino asitler ve valin, lösin, metiyonin (M), glisin ve alanin gibi hidrofobik amino asitler, peptitin antioksidan rolü için gereklidir. Peptitler, hidrofobik amino asit ve dizilerinde bir veya daha fazla histidin (H), prolin (P), sistein (C), tirozin (Y), triptofan (W), fenilalanin (F) veya metiyonin (M) kalıntısı içeriyorlarsa antioksidan aktiviteye sahip olabilirler. Serbest amino asitlerle karşılaştırıldığında peptitlerin daha yüksek oksidasyonu, amino asit diziliminin kendisi tarafından benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlanmaktadır (Akbarian ve diğ. 2022).

Elde edilmiş olunan kokoreç ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin bir ifadesini gösteren DPPH radikalini giderme aktivitesi (antiradikal aktivite, %ARA) Wang ve diğ. (2003) yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. DPPH radikali, koyu mor renk taşıyan kararlı organik nitrojen radikallerinden biri olarak bilinmekte ve renk kaybının ölçülmesine dayanmaktadır. Buna göre, elde edilmiş ekstraktlardan 0,1 ml alınarak vialler içerisine eklenmiştir. İnceleme için 2 adet vial hazırlanmış olup her bir vialde 0,1 mM konsantrasyonlu 5 ml DPPH çözeltisi eklenerek vorteks aracılığıyla karıştırma işlemi yapılmıştır. Hazırlanan karışım 27 °C 'de inkübe edilmiştir. 20 dk beklendikten sonra 517 nm dalga boyu ayarlanarak absorbanslar okunmuştur. Spektrofotometre kullanılırken kör çözelti olarak saf metanol, kontrol çözeltisi olarak 0,1 ml su eklenmiştir (Ergezer 2013).

Kalan DPPH yüzdesi aşağıda verilen formülle hesaplanmaktadır:

$$\text{DPPH Radikal Yakalama Kapasitesi (\%)} = \left[\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right] \times 100$$

A kontrol: Kontrol örneğinin absorbansı

A örnek: Test örneğinin absorbansı

5.2.8 Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi; IBM SPSS Statistics 29.0. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile

yapılmıştır. Bu analizin yapılmasındaki amaç aminoasit analizi sonucunda elde edilen aminoasit türleri, örnek türleri ve elde edilen sonuçlar arasında ilişki olup olmadığının tespit edilmesidir. Analizde kullanılan veri seti **Şekil 5.3**'te verilmiştir.

	AMINOACIDTYPE	CODE	AMOUNT	SAMPLES
1	cystine	1,00	4,18	1
2	methionine	2,00	1,80	1
3	norvaline	3,00	,00	1
4	isoleucine	4,00	2,45	1
5	leucine	5,00	,00	1
6	lysine	6,00	,89	1
7	hdroxyproline	7,00	5,08	1
8	sarcosine	8,00	3,48	1
9	proline	9,00	2,12	1
10	cystine	1,00	,00	2
11	methionine	2,00	,79	2
12	norvaline	3,00	3,24	2
13	isoleucine	4,00	,00	2
14	leucine	5,00	2,07	2
15	lysine	6,00	,76	2
16	hdroxyproline	7,00	5,24	2
17	sarcosine	8,00	,00	2
18	proline	9,00	2,28	2
19	cystine	1,00	,00	12
20	methionine	2,00	,78	12
21	norvaline	3,00	2,75	12
22	isoleucine	4,00	,00	12
23	leucine	5,00	1,68	12
24	lysine	6,00	1,13	12
25	hdroxyproline	7,00	10,76	12
26	sarcosine	8,00	,00	12
27	proline	9,00	2,34	12

Şekil 5.3: SPSS'te tanımlanan veri seti

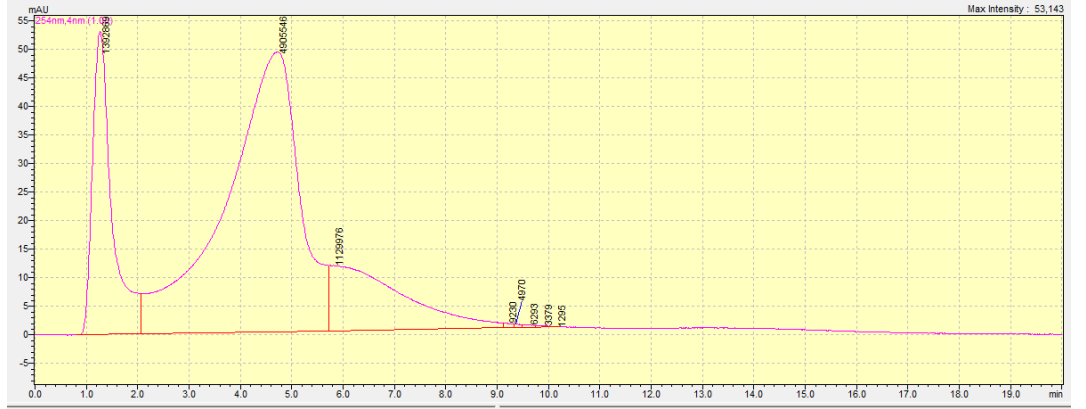
Tek yönlü ANOVA Analizi yapılırken **Şekil 5.3**'te görülen 'AMINOACIDTYPE' sütunundaki değerler 'CODE' sütununda numaralandırılarak tanımlamada oluşacak sorunların önüne geçmek ve veri tüpünde hata yapmamak amaçlanmıştır. Bu mantıkla 'CODE' sütunu bağımlı değişken, 'AMOUNT' sütunu ise bağımsız değişken olarak belirlenmiştir.

6. ARAŞTIRMA BULGULARI

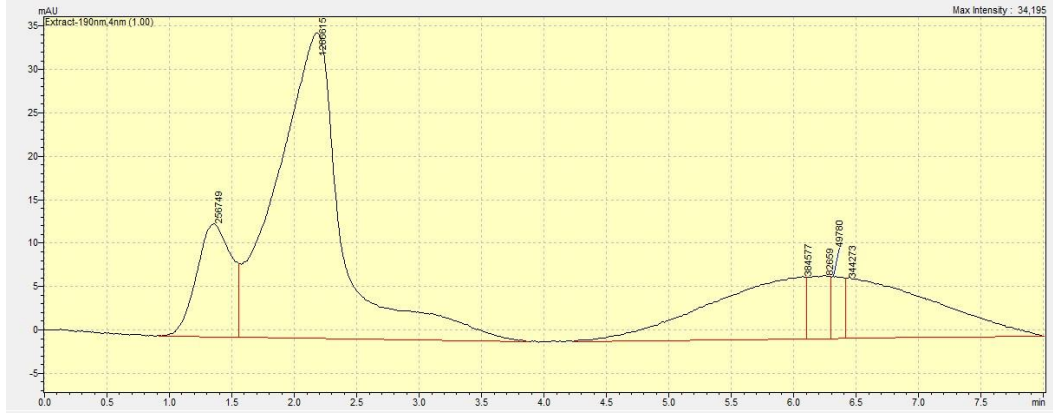
6.1 HPLC ile Fraksiyon Toplama

Fraksiyon toplama, ürün yüklendikten sonra belirli bir süre boyunca artık saflaştırılmış bir analit içeren elüatın seçici olarak toplanma işlemidir. Kaplar, her biri yalnızca tek bir analit piki toplayacak şekilde hareket ettirilerek uygun şişelere doldurulmuştur. Analiz yapılırken her yüklemde 1 veya 2 pik görülmüştür. Bu ürünlerden fraksiyon toplanırken 1. Pik, 2. Pik, 1 ve 2. Pik olmak üzere 3 örnek farklı şişelerde toplanarak HPLC-DAD ile aminoasit analizi yapılmasına zemin oluşturmaktadır.

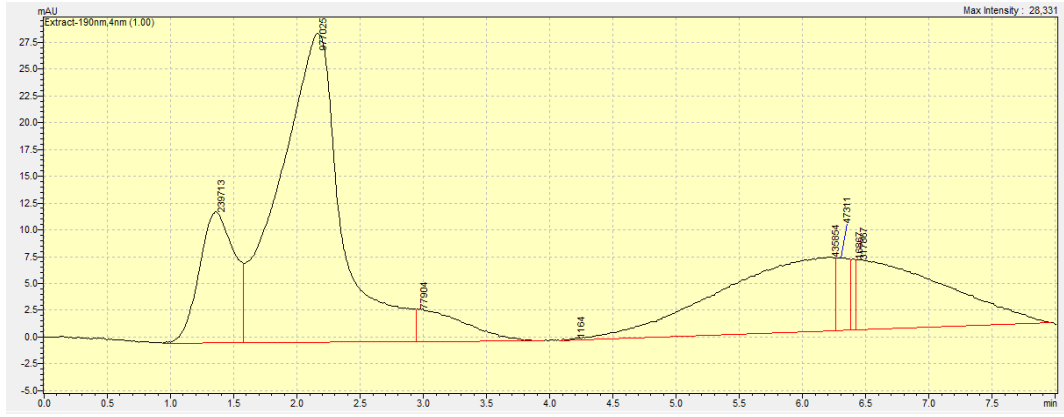
HPLC’de göz önüne alınan aminoasitler *Proline* ve *Hydroxyproline*’dir. Toplamda 29 yükleme yapılmış ve bunlardan üçünü gösteren grafikler **Şekil 6.1**, **Şekil 6.2** ve **Şekil 6.3**’te verilmiştir.



Şekil 6.1: HPLC 1. Yükleme grafiği



Şekil 6.2: HPLC 5. Yükleme grafiği



Şekil 6.3: HPLC 6. yükleme grafiği

Şekil 6.1, Şekil 6.2 ve Şekil 6.3'te incelendiğinde Prolinin varlığına bakılarak elde edilen pikleri göz önüne alarak kokorecin antioksidan aktivite etkisi olabileceğini söyleyebiliriz (Akbarian ve diğ. 2022). Kokoreç biyoaktif peptiti içerisindeki diğer aminoasitlerin tespiti ise HPLC-DAD ile aminoasit analizi sonucunda görülecektir.

6.2 HPLC-DAD ile Aminoasit Analizi

Gönderilen örnekler (1), (2) ve (1 2) olmak üzere 3 adettir. **Tablo 6.1**'de ise analiz sonuçlarına göre örnek türlerinden elde edilen aminoasit türleri ve konsantrasyonlarıyla orantılı miktarları ($\mu\text{g/mL}$) verilmiştir.

Tablo 6.1: Aminoasit analizi sonuçları

	1 ($\mu\text{g/mL}$)	2 ($\mu\text{g/mL}$)	1 2 ($\mu\text{g/mL}$)
cystine	4,18	0,00	0,00
methionine	1,80	0,79	0,78

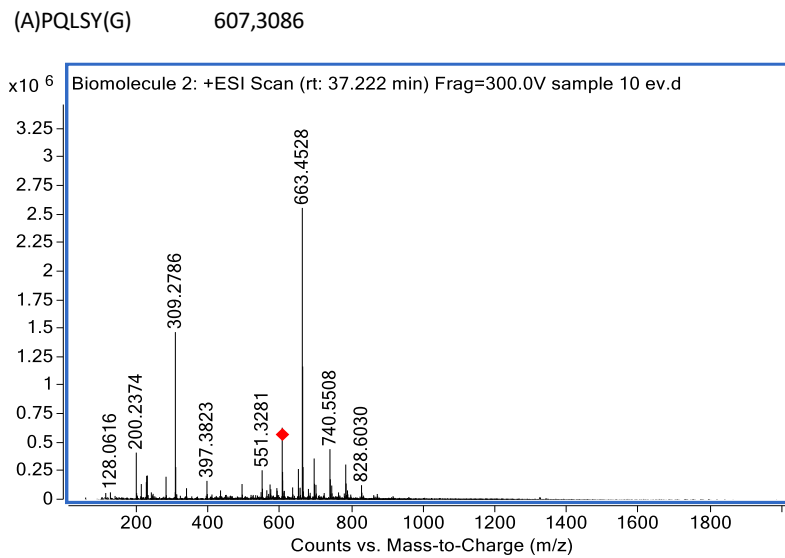
norvaline	0,00	3,24	2,75
isoleucine	2,45	0,00	0,00
leucine	0,00	2,07	1,68
lysine	0,89	0,76	1,13
hdroxyproline	5,08	5,24	10,76
sarcosine	3,48	0,00	0,00
proline	2,12	2,28	2,34

Ayrıca analiz sonucunda örneklere göre elde edilen pikleri gösteren analiz grafikleri de **EK A**, **EK B** ve **EK C**'de verilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre Akbarian ve diğ. (2022) metoduna göre kokoreç içerisinde *Leucine*, *Methionine*, *Proline*, *Cystine* varlığı tespit edildiğinden kokoreç içerisindeki antioksidan peptitlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

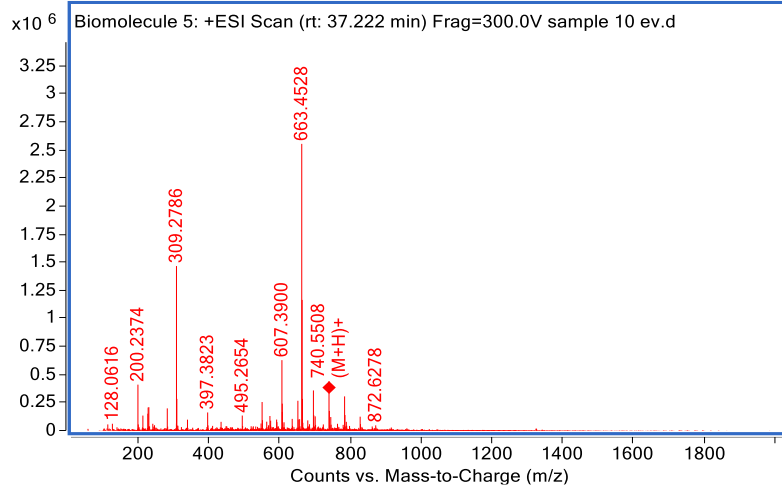
6.3 LC/Q-TOF /MS ile Biyoaktif Peptit Diziliminin Belirlenmesi

Peptitlerin tanımlanmasında Agilent Teknolojisi'nden bir sıvı kromatograf (model 1260) ile birleştirilmiş bir yüksek hassasiyetli kütle spektrometresi Agilent serisinden QTOF (Seri 6550) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen sonuçta pepsin enzimi göz önünde bulundurulmuştur. Tespit edilen peptit dizilimleri ve grafikleri aşağıda verilmiştir.



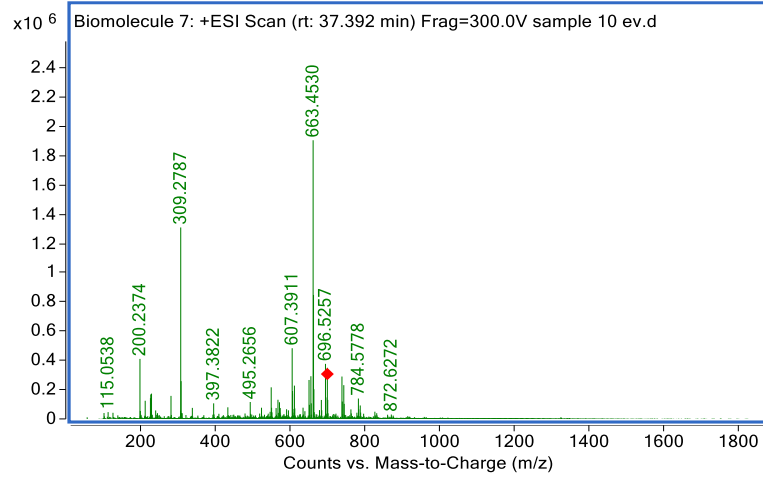
Şekil 6.4: (A)PQLSY(G) dizimli peptit grafiği

(F)DIGSVCF(L) 740,3284



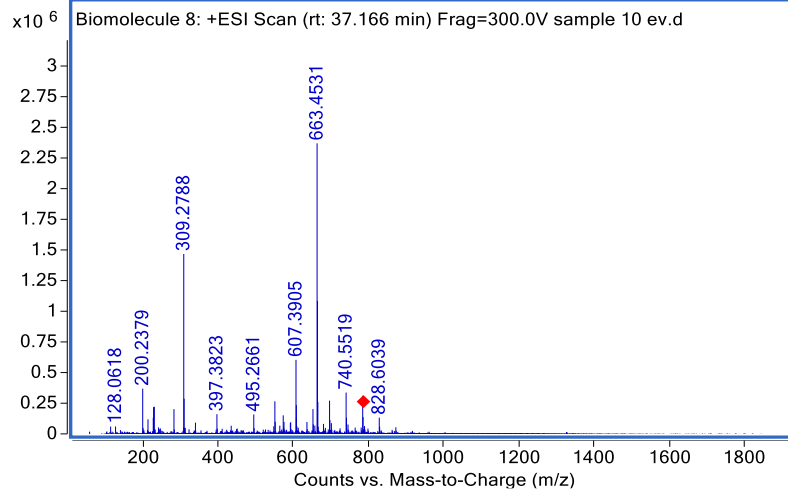
Şekil 6.5: (F)DIGSVCF(L) dizilimli peptit grafiği

(I)KGHRGF(S) 701,3842



Şekil 6.6: (I)KGHRGF(S) dizilimli peptit grafiği

(W)KPVPCQI(C) 784,4386

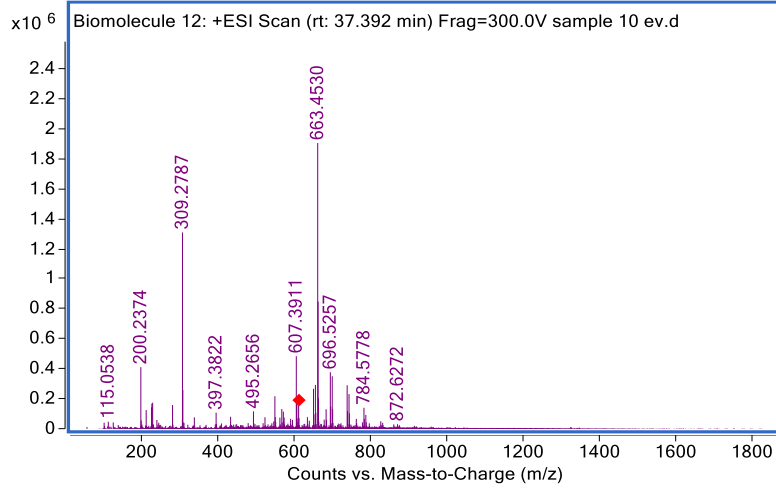


Şekil 6.7: (W)KPVPCQI(C) dizimli peptit grafiği

(L)GAPGPSGA(R) 613,294

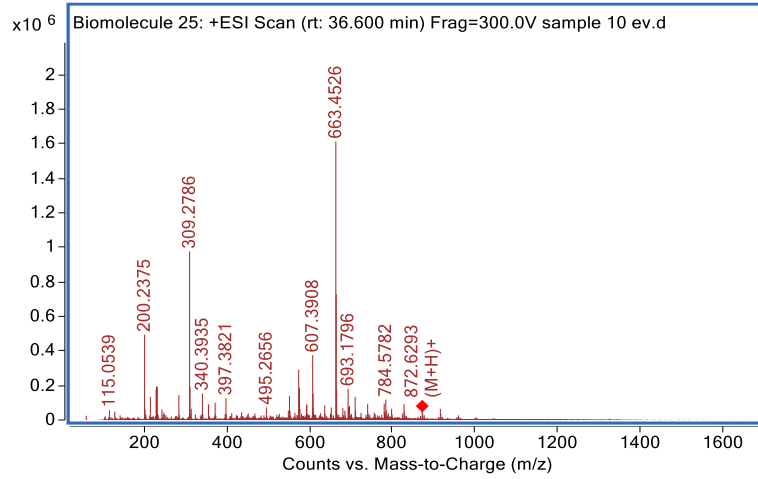
(L)QGPPGSA(G) 613,294

(A)VSPPTL(S) 613,3556



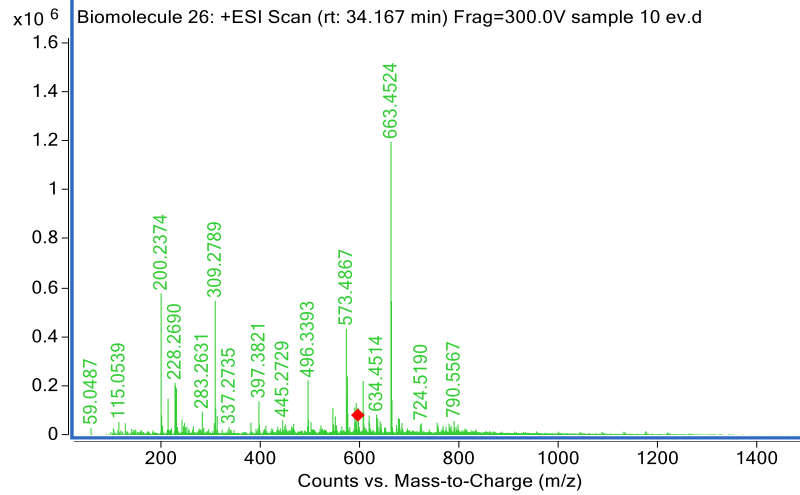
Şekil 6.8: (L)GAPGPSGA(R), (L)QGPPGSA(G) ve (A)VSPPTL(S) dizimli peptit grafiği

(L)QGSNEIEI(R) 872,3996



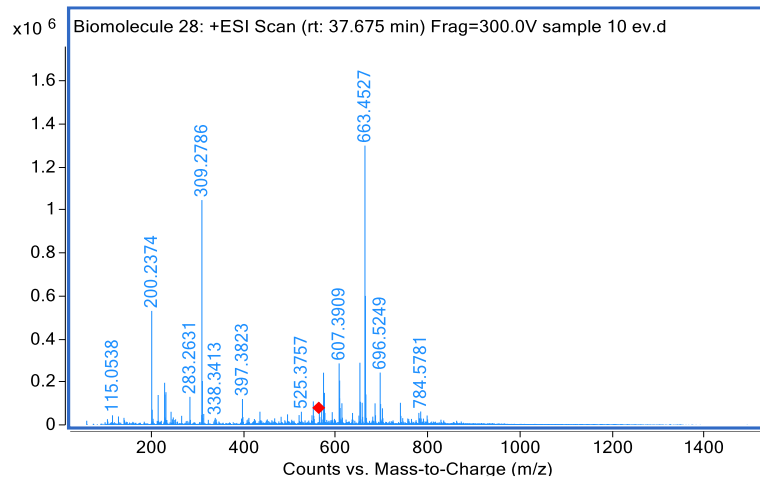
Şekil 6.9: (L)QGSNEIEI(R) dizimli peptit grafiği

(F)PGPKGAA(G) 597,3355



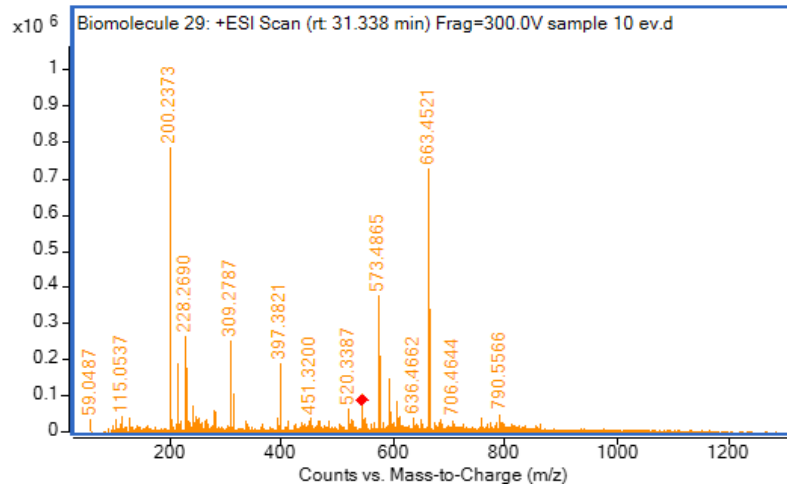
Şekil 6.10: (F)PGPKGAA(G) dizimli peptit grafiği

(L)CDDVI(C) 564,2334



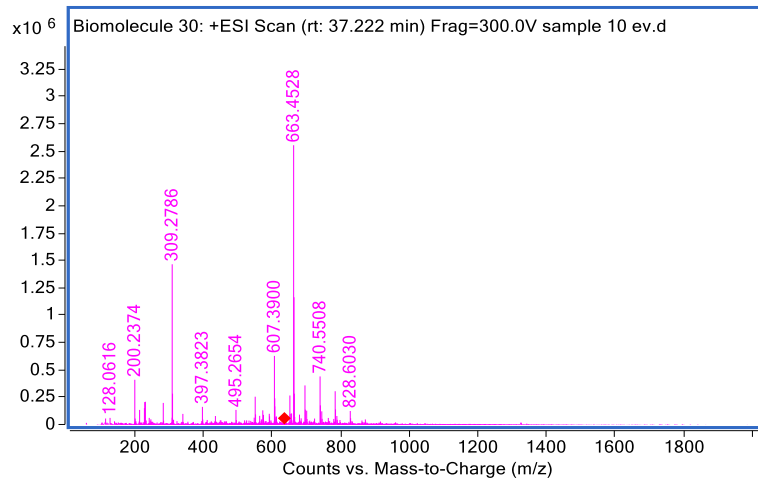
Şekil 6.11: (L)CDDVI(C) dizimli peptit grafiği

(A)DGQPGA(K) 544,2362



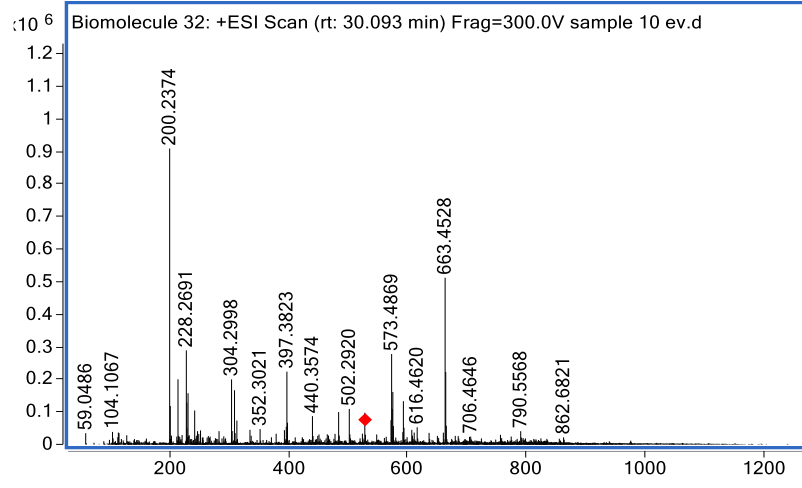
Şekil 6.12: (A)DGQPGA(K) dizimli peptit grafiği

(L)SAHGPPA(L) 636,31



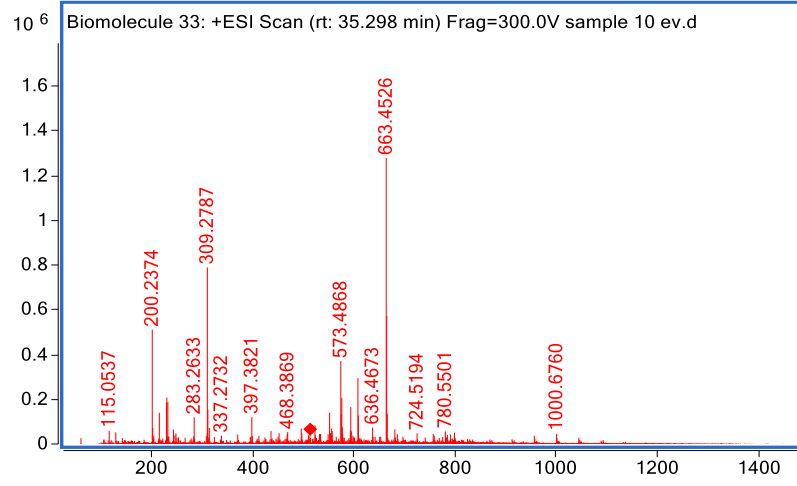
Şekil 6.13: (L)SAHGPPA(L) dizimli peptit grafiği

(A)NGAPGI(A) 528,2776

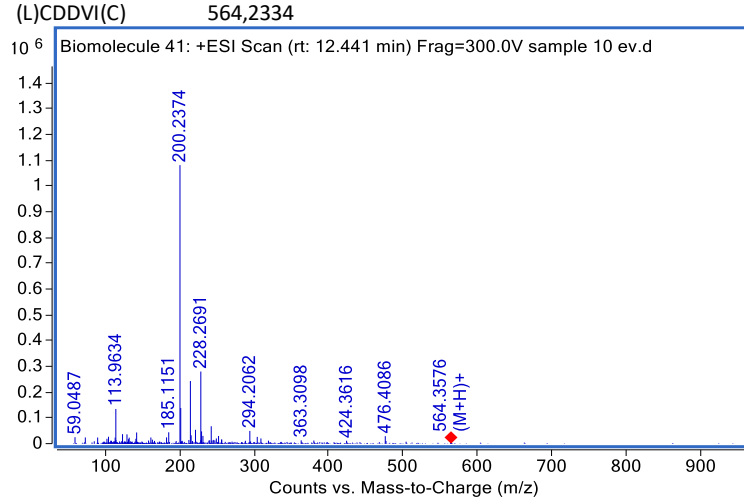


Şekil 6.14: (A)NGAPGI(A) dizimli peptit grafiği

(I)GSVCF(L) 512,2173



Şekil 6.15: (I)GSVCF(L) dizimli peptit grafiği



Şekil 6.16: (L)CDDVI(C) dizilimli peptit grafiği

Şekil 6.4'ten Şekil 6.16'ya kadar verilen görsellerde analiz sonucu alınan fraksiyonlar ve tespit edilen peptit dizilimleri gösterilmiştir. Örneğin Şekil 6.16'daki 564,2324 değerinin birimi Da olup kütle değerini göstermektedir, bu gösterim diğer dizilimler için de aynı bakış açısı ile incelenmelidir.

6.4 Biyoaktif Peptit Veritabanı ile Peptitlerin Tanımlanması

LC/Q-TOF /MS ile belirlenen peptit dizilimlerine göre BIOPEP-UWM'de arama yapılarak bulunan peptit aktiviteleri belirlenerek **Tablo 6.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 6.2: Peptit dizilimlerine göre aktiviteleri (Minkiewicz ve diğ. 2019)

Protein Dizilimi:	Aktivite:
(A)DGQPGA(K)	ACE inhibitor, antiamnesic, antithrombotic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, neuropeptide, PAM inhibitor, regülator
(A)NGAPGI(A)	ACE inhibitor, antiamnesic, antithrombotic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, PAM inhibitor, regülator
(A)PQLSY(G)	ACE inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor
(A)VSPPTL(S)	ACE inhibitor, alpha-glucosidase inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor
(F)DIGSVCF(L)	ACE inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor
(F)PGPKGAA(G)	ACE inhibitor, antiamnesic, antioxidative, antithrombotic, chemotactic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, hypotensive, inhibitor, PAM inhibitor, regülator
(I)GSVCF(L)	ACE inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor
(I)KGHRGF(S)	ACE inhibitor, dipeptidyl peptidase III inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, Leucyltransferase inhibitor

(L)CDDVI(C)	dipeptidyl peptidase IV inhibitör
(L)GAPGPSGA(R)	ACE inhibitor, antiamnesic, antithrombotic, chemotactic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, inhibitor, PAM inhibitor, regülatör
(L)QGPPGSA(G)	ACE inhibitor, alpha-glucosidase inhibitor, antiamnesic, antioxidative, antithrombotic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, PAM inhibitor, regülatör
(L)QGSNEIEI(R)	ACE inhibitor, dipeptidyl peptidase IV inhibitor
(L)SAHGPPA(L)	ACE inhibitor, alpha-glucosidase inhibitor, antiamnesic, antioxidative, antithrombotic, dipeptidyl peptidase IV inhibitor, regülatör
(W)KPVPCQI(C)	ACE inhibitor, antioxidative, dipeptidyl peptidase IV inhibitör

6.5 DPPH ile Antioksidan Aktivite

0,1 mM DPPH için;

$$0,1 \frac{mmol}{L} \times 394,32 \frac{g}{mol} \times \frac{1L}{1000ml} = 0,394 \frac{mg}{ml}$$

Analiz için 20 ml antioksidan aktivite tayini için yeterli gelecekse;

$$20 \times 0,394 = 7,88 \text{ mg}$$

0,00788 g olarak tartılacak miktar belirlendi. Spektrofotometrede metotta anlatıldığı gibi ürünler yerleştirilip absorbansı 517 nm olacak şekilde ayarlanıp okuma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.3'te verilmiştir.

Sonuç olarak;

Tablo 6.3: Spektrofotometrede okunan değerler

Numune örneği absorbansı:	3,4362
Kontrol örneğinin absorbansı:	3,9133

Formüle göre yapılan hesaplama aşağıdaki gibidir;

$$\%ARA = [(3,9133 - 3,4362) / 3,9133] \times 100$$

$$\%ARA = 0,1219 \times 100$$

$$\%ARA = 12,19$$

Hesaplama sonucunda DPPH katsayısı 0,1219 bulunmuştur.

6.6 Aminoasit Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Analiz yapılırken çıkan Aminoasit Analizinde tespit edilen Aminoasit türleri

Tablo 6.4'te gösterildiği gibi kodlanmıştır.

Tablo 6.4: SPSS aminoasit adı kodlama

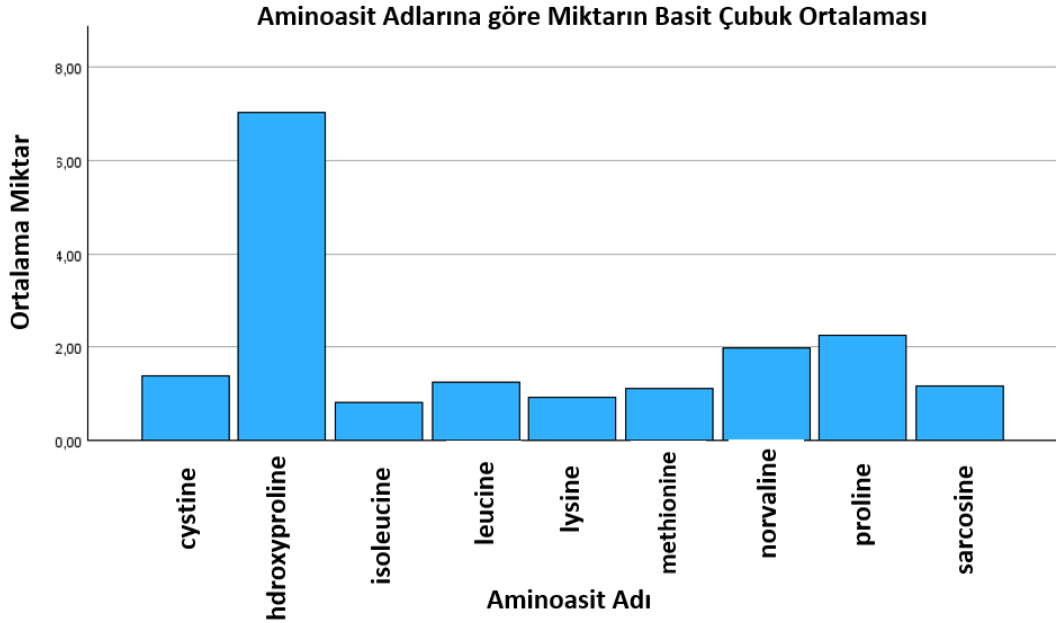
Aminoasit Adlandırması	Verilen Kod
Cystine	1
Methionine	2
Norvaline	3
İsoleucine	4
Leucine	5
Lysine	6
Hdroxyproline	7
Sarcosine	8
Proline	9

Tek yönlü ANOVA uygulanarak bağımlı ve bağımsız değişkenler üzerinden yapılan analiz sonucu **Tablo 6.5**'te verilmiştir.

Tablo 6.5: ANOVA sonucuna göre veri tanımlamaları

MİKTAR	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
1,00	3	1,3933	2,4133	1,3933
2,00	3	1,1233	0,5860	0,3383
3,00	3	1,9967	1,7463	1,0083
4,00	3	0,8167	1,4145	0,8166
5,00	3	1,2500	1,0999	0,6350
6,00	3	0,9267	0,1877	0,1083
7,00	3	7,0267	3,2341	1,8672
8,00	3	1,1600	2,0091	1,1600
9,00	3	1,2467	0,1137	0,0656
Toplam	27	1,9933	2,3599	0,4541

Tablo 6.5 incelendiğinde ortaya çıkan 9 çeşit aminoasitin; örnek sayısı, ortalama, standart sapma değerlerine ulaşılmıştır. Burada konsantrasyonla orantılı bulunma kütlesi en fazla olan aminoasitin 7 koduna sahip *Hdroxyproline* olduğu; en azın ise 4 koduna sahip *İsoleucine* olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.17: Tespit edilen aminoasitlerin grafik gösterimi

Şekil 6.17'de HPLC-DAD ile yapılmış olan Aminoasit diziliminde tespit edilmiş Aminoasitlerin bulunma kütlelerinin gösterimi için grafik yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 6.6: ANOVA sonuçları

	Kareler toplamı	Serbestlik Derecesi (df)	Kareler Ortalaması	F	Sigma
Gruplar Arası	90,855	8	11,357	3,789	,009
Grup İçi	53,946	18	2,997		
Toplam	144,801	26			

Tablo 6.6 incelendiğinde Sigma değeri 0,009 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,05'ten küçük olduğu için örneklerde çıkan aminoasit türlerinin miktarları arasında kuvvetli farklılık vardır diyebiliriz.

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında bazı durumlar saptanmıştır; öncelikle ekstraksiyon hazırlama işleminden beri yapılacak her analizde 3'ten fazla örnekle paralel gidilerek çalışmanın güvenliği artırılmalıdır. Bu önemli bir noktadır çünkü çalkalamalı su banyosu, santrifüj gibi hareketli sistemlerde veya dondurarak kurutma gibi güçlü ısıtma işlemlerde; hazırlanan numunenin uçması, şişesinin kırılması gibi beklenmeyen durumlar görülebilmektedir. Bu durumların analiz faaliyetlerinde aksamaya sebep olmasını engellemek için az önce bahsedilen paralel çalışmaların yapılması oldukça önem taşımaktadır.

Dondurarak kurutma işleminde hazırlanan metot 12 saat Liyoflizatörde bekletmek olsa da her 4 saatte bir örnekler kontrol edilerek aşırı kurumanın önüne geçilmelidir. Aksi takdirde ürün fazla kuruyarak numune şişesine yapışıp sertleşecek ve kazınması zor olacaktır. İçerisindeki çözelti tamamen uçup ürün kuru hale geldiğinde kontrollü bir şekilde dondurarak kurutma işlemi tamamlanabilir.

HPLC ile fraksiyon toplama işlemi yapılırken kolonun yeni olması, fazla veya az yüklemekten kaçınılması, mobil fazın yeni hazırlanmış olması analizde alınan piklerin daha doğru görünmesini sağlayacaktır.

Tez taslağında HPLC-DAD ile Aminoasit analizi yapılmak yer almamaktaydı fakat biyoaktif peptitler incelenirken konunun daha net anlaşılması için aminoasit türlerinin göz ardı edilmemesi gerektiği düşünüldüğünden çalışma konusunda bu analiz de dahil edilmiştir.

Aminoasit aktivitenin incelenmesi için kullanılan DPPH katsayısı sonucu 0,12 bulundu. Ayrıca Leucine, Methionine, Proline, Cystine aminoasitlerin bulunması ile antioksidan aktivite hakkında yorumlarda bulunuldu. Buradan kokoreç içerisindeki biyoaktif peptitlerin antioksidan özellik gösterdiğini fakat bunun çok kuvvetli olmadığını söyleyebiliriz. Kesin olarak belirlemek için peptit dizilimleri ile detaylı analizlere başvurulabilir.

Jang ve diğ. (2008), ticari enzimler kullanılarak sığır sarkoplazmik protein hidrolizatlarından ayrıştırılarak yüksek anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör etkisine sahip dört peptit elde etmişlerdir. Bu peptitler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip sığır sarkoplazmik proteinlerinden türetilen birkaç peptit bulunmuştur. Bunlar GFHI, DFHING, FHG ve GLSDGEWQ olarak tanımlanmış ve ACE'ye karşı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC50) değerleri sırasıyla 117, 64,3, 52,9 ve 50,5 lg/ml olarak bulunmuştur. Bu peptitler sentezlenmiş ve bu dört peptidin antimikrobiyal, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki ve makrofaj uyarıcı etki dahil olmak üzere diğer biyolojik aktiviteleri ölçülmüştür. ACE inhibitör peptitlerin hem antimikrobiyal hem de kanser hücresi sitotoksik etkilerinin olması beklenmektedir.

Doğrudan etten elde edilen biyoaktif bir peptidin önemli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu kanıtlayan çok az bilinen bir makale vardır (Bhat, Z. F. ve diğ. 2015).

Bu çalışma sonuçları incelendiğinde de kokoreçten elde edilen biyoaktif peptitlerde de sığır etindeki gibi antimikrobiyal aktivite bulunmadığı; ACE inhibitör, anti-amnestik, antioksidatif, antitrombotik aktivitelerin yoğunlukta olduğu söylenebilir. Bu çalışma ile biyoaktif peptitlerde kokorecin birçok aktivite gösterdiği kanıtlandığından sağlık, kozmetik, gıda gibi sektörlerde nasıl değerlendirilebileceği de diğer çalışmalara yön gösterebilir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kuzu kokoreci numunesi alınarak biyoaktif peptitlerinin açığa çıkartılarak aminoasit içeriği, biyoaktif peptit aktiviteleri ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla kokoreç örneğinin suda çözünen ekstraktlarının hazırlanması için homojen hale getirme ve asitle ön uygulamaya maruz bırakma işlemleri yapılmıştır. Su banyosundan ve filtreden geçirme işlemleri de tamamlanarak çözeltinin buharlaştırılması için 45°C'de vakum altında çözeltinin buharlaştırılması amacıyla evapore edilmiştir. Elde edilen konsantrat dondurularak kurutulmuş ve kuru materyal -20°C'de bir sonraki analize kadar saklanmıştır. Bir sonraki analiz olan ortamda enzimatik hidroliz in vitro ortamda yapılarak pepsin ve tripsin enzimleriyle peptitlerin biyoaktif hale getirilmesi sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada HPLC ile Prolin ve Hydroxyprolin varlığını kontrol etme ve fraksiyon toplama işlemleri yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlar 3 adet numune olacak şekilde şişelenerek -20°C'de muhafaza edilmiştir. Burada incelenen ürün içerisinde Prolin ve Hydroxyprolin varlığı kanıtlanarak diğer aminoasitlerin de tanımlanması için örnekler Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Arş. Merkezi'ne gönderilerek HPLC-DAD ile Aminoasit Analizi ve LC/Q-TOF/MS ile Peptit Analizi yapılmıştır. HPLC-DAD analizi yapılırken 150 mm Kolon, 2 adet mobil faz ve 1 adet sabit faz kullanılmıştır.

Aminoasit analizi sonucunda kokoreçteki biyoaktif peptit içeriğindeki aminoasitler şu şekilde tespit edilmiştir: cystine, methionine, norvaline, isoleucine, leucine, lysine, hidroxyproline, sarcosine, proline. Bu aminoasitlerin bulunma durumu ve miktarı örneklerle göre değişiklik göstermiştir.

LC/Q-TOF/MS ile yapılan analiz sonucunda ise kokoreçte bulunana biyoaktif peptitler ve kütleleri bulunarak peptit dizilimi elde edilmiştir. Bulunan sonuçlar incelenerek BIOPEP-UWM veri tabanında işlenerek her peptit diziliminin aktiviteleri tespit edilmiştir. Buradan çıkartılan sonuçta kokorecin içerisindeki biyoaktif peptitlerin farklı seviyelerde; ACE inhibitörü, alfa-glukozidaz inhibitörü, antiamnestik, antioksidatif, antitrombotik, kemotaktik, dipeptidil peptidaz III inhibitörü, dipeptidil peptidaz IV inhibitörü, hipotansif inhibitör, lösiltransferaz

inhibitörü, nöropeptid, PAM inhibitörü, düzenleyici aktiviteye sahip olabileceği düşünülmüştür.

Bir sonraki inceleme konusu olan Antioksidan aktivite için spektrofotometre ile değerler okunarak DPPH metodu ile antiradikal aktivite değeri 0,12 olarak bulunmuştur.

Son olarak analiz sonuçları arasındaki ilişkinin tespit edilmesi için tek yönlü ANOVA Analizi yapılarak örneklemelere göre aminoasit miktarları arasında kuvvetli farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda, yapılacak diğer çalışmalar için bazı yorum ve öneriler aşağıda listelenmiştir:

- Kokoreç için LC-MS analizi yapılarak peptit dizilimi yapılmak amaçlanmıştı fakat analizin ürün için uygun olmadığı dönütü alındığı için yapılamadı. Bir sonraki çalışmalar için bu analizin de eklenerek peptit dizilimlerinin bulunmasıyla biyoaktif peptit içindeki tüm aktivitelerin incelenmesiyle çalışmanın zenginleştirilmesi,
- Kokoreç örneklerinin sığır ve kuzu olmak üzere ya da birden farklı yerden farklı kuzu kokoreci örneği alınarak kıyaslamaların yapılması,
- Kokoreç ve diğer sakatat türlerinden örnekler seçilip biyoaktif analizlerinin yapılarak farklı sakatat türleri arasında antikanserojen etki gösteren sakatatların aktivitelerinin kıyaslanarak geniş bir bakış açısının sağlanması tavsiye edilmektedir.

9. KAYNAKLAR

Adje, E.Y., Balti, R., Kouach, M., Guillochon, D., and Nedjar-Arroume, N.,” α 67-106 of Bovine hemoglobin: A new family of antimicrobial and angiotensin 1-converting enzyme inhibitory peptides”, *Eur. Food Res. Technol*, 232, 637–646, doi: 10.1007/s00217-011-1430-z, (2011).

AdvanceBio (Anonymous), <https://www.agilent.com/en/product/biopharma-hplc-analysis/amino-acid-cell-culture-analysis/advancebio-amino-acid-analysis-aaa>, AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), (Accessed on 23 November 2023).

Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., and Uversky, V.N., “Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action”, *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 1445, doi: [10.3390/ijms23031445](https://doi.org/10.3390/ijms23031445), (2022).

Akgöl, M., Alan S., ve Öksüztepe, G., “Elazığ’da tüketime sunulan kokoreçlerin mikrobiyolojik kalitesi”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 37 (2), 114-121, (2023).

Akhmadeeva, L., “Farklı kaynaklardan enzimatik hidroliz yoluyla biyoaktif peptid eldesi ve biyolojik etkinliklerinin incelenmesi”, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2018).

Aluko, R., “Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation.” In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Elsevier: Amsterdam, The Neterlands, 105–140, (2015).

Anıl M, Kılıc O, Baskaya D, Dincer M, and Aydın, G., “Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi öğrencilerinin fast-food tipi beslenme alışkanlığı”. In: *Proceedings of the Samsun Symposium*, Samsun, Turkey, (2011).

Arihara, K. and Ohata, M., “Bioactive compounds in meat”, In: Toldrá, F. (eds), *Meat Biotechnology*; Springer, New York, NY. DOI: 10.1007/978-0-387-79382-5_11, (2008).

Babaoglu, A. S., Karakaya, M. and Öz, F., “Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and lamb kokorec: Effects of different animal fats”, *Int. J. Food Prop.*, 20:9, 1960-1970, doi:10.1080/10942912.2016.1225761, (2017).

Badii, F. and Howell, N.K., “Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins”, School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey, *Food Hydrocoll.*, 20, 630–640, doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.06.006, (2006).

Barberis, S.E., Origone, A.L., Adaro, M.O., and Bersi, G., “Bioactive peptides as functional food ingredients”, In: Grumezescu AM, Holban AM, editors. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, London, United Kingdom: Elsevier, 147-86, (2018).

Besharati, M., and Lackner, M., “Bioactive peptides: a review”, *The EuroBiotech Journal*, 7 (4), 176-188, DOI: 10.2478/ebtj-2023-0013, (2023).

Bhat, Z. F., Kumar, S. and Bhat, H. F., “Bioactive peptides of animal origin: A review”, *J. Food Sci. Technol.*, 52 (9), 5377–5392, (2015).

Bilgin, B., Makarnacı, N., Palabiyik, İ., “The effect of different cooking process on microbiological quality of kokorec”, *International Journal of Research in Engineering and Technology (IJRET)*, 5 (5), 2319-1163, (2016).

Bizzotto, E., Zampieri, G., and Treu, L. “Classification of bioactive peptides: a comparative analysis of models and encodings”, Department of Biology, *University of Padua*, via U. Bassi 58/b, 35131 Padova, Italy, DOI: 10.1101/2023.10.04.560809, (2023).

Castellano, P., Aristoy, M.-C., Sentandreu, M. Á., Vignolo, G. and Toldrá, F., “Peptides with angiotensin 1 converting enzyme (ace) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne lactobacillus”, *J. Proteomics*, 89, 183–190, (2013).

Chakrabarti, S., Guha, S., and Majumder, K., “Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities”, *Nutrients*, 10(11), 1738, (2018).

Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., and Nokihara, K., “Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 49–53, (1998).

Daliri, E., Oh, D. H., and Lee, B. H., “Bioactive peptides”, *Foods*, 6 (32), DOI: 10.3390/foods6050032, (2017).

De Mejia, E., and Dia. V. P., “The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells”, *Cancer And Metastasis Reviews*, 29, 511–528, (2010).

Decker, E. H., Elliott, S., Smith, F. A., Blake, D. R. and Rowland, F. S., “Energy and material flow through the urban ecosystem” *Annu. Rev. Energy Environ.* 25 (1), 685–740, (2000).

Doyuk, F., and Dost, K., “Simultaneous determination of six antibiotics belonging to four different classes in chicken meat by HPLC/DAD and verification by LC-MS/MS”, *Food Chem.*, 426, DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136549, (2023).

Edebali, E., Özdemir, S. ve Özdemir, C., “Süt ve süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve insan sağlığı üzerine”, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 268-280, DOI: 10.21597/jist.698331, (2021).

Ege Matal (12.01.2024 tarihinde erişildi), Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kromatografi ve Spektroskopi Laboratuvarı, <https://egematal.ege.edu.tr/files/egematal/icerik/LC-MS1.pdf>

Ergezer, H., “Enginar atıklarından elde edilen ekstraktın çiğ ve pişirilmiş köftelerde antioksidatif etkilerinin araştırılması”, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, (2013).

Escudero, E., Mora, L., Fraser, P. D., Aristoy, M. C., and Toldrá, F., “Identification of novel antioxidant peptides generated in spanish dry-cured ham”, *Food Chem.*, 138, 2–3, 1282–1288, DOI:10.1111/j.1365-2621.2003.tb14115.x, (2013).

Farag, M., Alagawany, M., El-Hack, M., Tiwari, R. and Dhama, K., “Identification of different animal species in meat and meat products- Trends and advances”, *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 3, 334–346, (2015).

Gathercole, J., Maes, E., Thomas, A., Wieliczko, R., Grosvenor, A., Haines, S., Clerens, S. and Dep-Choudhury, A., “Unlocking the bioactivity of meat proteins: Comparison of meat and meat hydrolysate via simulated gastrointestinal digestion”, *J. Proteomics*, 273, DOI: 10.1016/j.jprot.2022.104806, (2023).

Haegerstam, G.A., “Pathophysiology of bone pain: A review”, *Acta Orthop. Scand.*, 72, 308–317, (2001).

İmofeeva, I., Timofeev, S., Moskvın, L., and Bulatoz, A., “A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat”, *Anal. Chim. Acta*, 949, 35-42, DOI: 10.1016/j.aca.2016.11.018, (2017).

Jang, A., Jo, C., Kang, K.-S. and Lee, M., “Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides”, *Food Chem.*, 107 (1), 327–336, (2008).

Kaba, N., Corapçı, B., and Eryasar K., “Production of kokoreç from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) and determination of shelf life”, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6 (2), 1308-3961, (2013).

Kara, R., Aslan, S., Yaman, H., ve Akkaya, L., “Afyonkarahisar’da tüketime sunulan kokoreçlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi”, *Kocatepe Veterinerlik Dergisi*, 6(1), DOI: 10.5578/kvj.5340, (2013).

Kęska, P., Wójciak, K. M., and Stadnik, J., “Bioactive peptides from beef products fermented by acid whey – In Vitro and in silico study”, *Sci. Agric.*, 76 (4), 311–320, (2019).

Kitts, D. and Weiler, K., “Bioactive proteins and peptides from food sources. applications of bioprocesses used in isolation and recovery”, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323, (2003).

Li, X.X., Han, L.J., and Chen, L.J., “In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal”, *J. Sci. Food Agric*, 88, 1660–1666, (2008).

Lundberg, U, “Stress, subjective and objective health”, *Int. J. Soc. Welf.*, 15, 41–48, (2006).

Madhu, M., Kumar, D., Sirohi, R., Tarafdar, A., Dhewa, T., Aluko, R.E., Badgujar, P.C. and Awasthi, M.K., “Bioactive peptides from meat: current status on production, biological activity, safety, and regulatory framework”, *Chemosphere*, 307, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.135650, (2022).

Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., and Yada, R. Y., “Plant proteases for bioactive peptides release: A Review”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-17, (2017).

Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, S.-K., “Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 581–587, (2005).

Milan, B. Z., Marija, B., Jelena, I., Marija, D., Radmilla, M. and Tatjana, B., “Bioactive peptides from meat and their influence on human health”, *Technologija Mesa*, 1 (2), 8-21, DOI: 10.5937/tehmesa1401008B, (2014).

Minkiewicz P., Iwaniak A., and Darewicz M., “BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities”, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5978, DOI: 10.3390/ijms20235978, (2019).

Morimatsu, F., Ito, M., Budijanto, S., Watanabe, I., Furukawa, Y. and Kimura, S., “Plasma cholesterol suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet”, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo), 42 (2), 145–153, (1996).

Ngoc, L.T.N., Moon, J.-Y., and Lee, Y.-C., “Insights into bioactive peptides in cosmetics”, *Cosmetics*, 10, 111, DOI: 10.3390/cosmetics10040111, (2023).

Osborne, R., Mcildowie, M.J., and Edwards, J.D., “Skin care product and method of use 2018”, U.S. Patent No 10,034,827, (2018).

Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Nielsen, M. S., “Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis”, *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472, (2007).

Özcan, Yardım, D., “İnek, Koyun ve Keçi Sütlerinden Üretilen Van Otlı Peynirlerinin Biyoaktif Peptit Profillerinin Belirlenmesi”, *Yıldız Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı, Doktora Tezi*, (2023).

Özcan A., *Et Bilimi ve Teknolojisi*, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Yayınları, Ankara, Yayın No:1, 78–81, (2005).

Papo, N. and Shai, Y., “Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?”, *Peptides*, 24, 1693–1703, (2003).

Pedrouso, M. L., Zaky, A.A., Lorenzo, J.M., Camina, M. and Franco, D., “A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological activities, applications and limitations”, *Meat Science*, 204 (10), DOI: 10.1016/j.meatsci.2023.109278, (2023).

Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismägi, J., Gröhn, O., and Nissinen, J., “Epileptogenesis in experimental models”, *Epilepsia*, 48, 13–20, (2007).

Pradeepa, R., and Mohan, V., “Hypertension & Pre-hypertension in developing countries”, *Indian J. Med. Res.*, 128, 688, (2008).

Pruimboom, L., and Van Dam, A., “Chronic pain: A Non-use disease”, *Med. Hypotheses*, 68, 506–511, (2007).

Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R. and Wilkinson, B. H. P., “Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme q(10), and creatine”, *Meat Sci.*, 66 (3), 629–37, (2004).

Purchas, R. W., and Busboom, J. R., “The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme q10 and creatine in beef muscles and liver”, *Meat Sci.*, 70 (4), 589–596, (2005).

Ranathunga, S., Rajapakse, N., and Kim, S.-K., “Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*)”, *Eur. Food Res. Technol.*, 222, 310–315, (2006).

Rashid, H.A., “Hydrolysis of bioactive peptides from bulgur waste”, *Gaziantep University, Natural and Applied Sciences, Food Engineering, Master Degree*, (2020).

Rezaharsanto, B., and Subroto, E., “A review on bioactive peptides derived from various sources of meat and meat by-products”, *International Journal of Scientific & Technology Research*, 8 (12), 2277-8616, (2019).

Rizwan, D., Masoodi, F. A., Wani, S. M., and Mir, S. A “Bioactive peptides from fermented foods and their relevance in COVID-19 mitigation”, *Food Production, Processing and Nutrition*, 5, 53, DOI: 10.1186/s43014-023-00165-w, (2023).

Sato, H., Feix, J.B., and Frank, D.W., “Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the pseudomonas Type III Toxin”, *ExoU. Biochemistry*, 45, 10368–10375, (2006).

Sewald, N. and Jakubke, H., “Peptide synthesis”, In: Peptides: Chemistry and Biology, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & CO, KGaA, 175-315, DOI:10.1002/352760068X, (2002)

Shimada, S., Inoue, Y. T. and Sakuta, M., “Anthocyanidin synthase in non-anthocyanin-producing”, *Caryophyllales species*, 44 (6), 950–959, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02574.x, (2005).

Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y. and Yamamoto, J., “Antithrombotic papain hydrolyzed peptides isolated from pork meat”, *Thromb. Res.*, 123 (5), 753–757, (2009).

Sohaib, M., Anjum, F. M., Sahar, A., Arshad, M. S., Rahman, U. U., Imran, A. and Hussain, S., “Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A Comprehensive Review”, *Int. J. Food Prop.*, 20, 2581–2593, DOI: 10.1080/10942912.2016.1246456, (2017).

Song, R., Jia, Z., Shi, Q., Wei, R. and Dong, S., “Identification of bioactive peptides from half-fin anchovy (*Setipinna Taty*) hydrolysates and further modification using maillard reaction to improve antibacterial activities”, *J. Funct. Foods*, 58, 161-171, DOI: 10.1016/j.jff.2019.05.001, (2019).

Sultan, S., Huma, N., Butt, M.S., Aleem, M., and Abbas, M., “Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: a Contemporary perspective”, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 58(1), 105-15, (2018).

Susanto, E., Fadlillah, A., and Amin, M. F., “Synthesis, extraction and identification of meat bioactive peptides: a review”, 2nd International Conference on Animal Production for Food Sustainability, IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 888, DOI: 10.1088/1755-1315/888/1/012058, (2021)

Temelli, S., Saltan, Evrensel, S., Anar, Ş., ve Tayar, M., “Bursa’da tüketilen kokoreçlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi”, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 28(2), 467-473, (2002).

Thoresen, P.P., Alvarez, R.G., Vaka, M.R., Rustad, T., Sone, I. and Fernandez, E.N., “Potential of innovative pre-treatment technologies for the revalorisation of residual materials from the chicken industry through enzymatic hydrolysis”, *Innov Food Sci Emerg Technol*, 64, DOI: 10.1016/j.ifset.2020.102377, (2020).

Ünal, M.Ü., Şener, A., ve Cemek, K. (2018), “Biyoaktif peptitlerin sağlık üzerine etkileri”, *GIDA*, 43 (6), 930-942, DOI: 10.15237/gida.GD18048, (2018).

Wootton, M., “Morphine is not the only analgesic in palliative care: Literature review”, *J. Adv. Nurs.*, 45, 527–532, (2004).

Yalçın, E., ve Rakıcıoğlu, N., “Biyoaktif besin peptitleri ve sağlık üzerine etkileri”, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (2), 241-246, (2020).

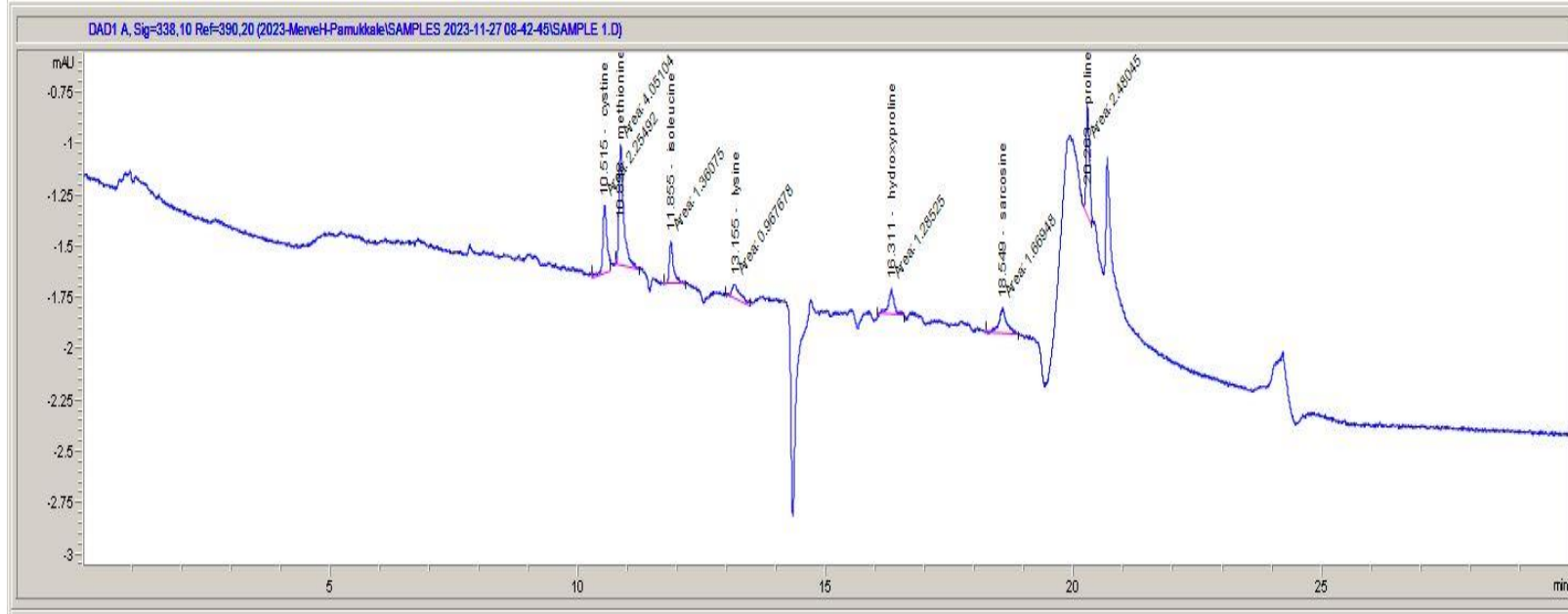
Yardım, N., Kocadağ, S., Kelat, E. Z., Adıgüzel, Ö. S., Atabey, M., ve Saygı, M., “Birinci basamak sağlık kurumları için obezite ve diyabet klinik rehberi. türkiye halk sağlığı kurumu”, Yayın No 1070, (2017).

Yergöz, F., “Bioactive peptide nanofibers for acceleration of burn wound healing”, *Bilkent University, Engineering and Science, Materials Science and Nanotechnology*, Master Degree, (2017).

EKLER

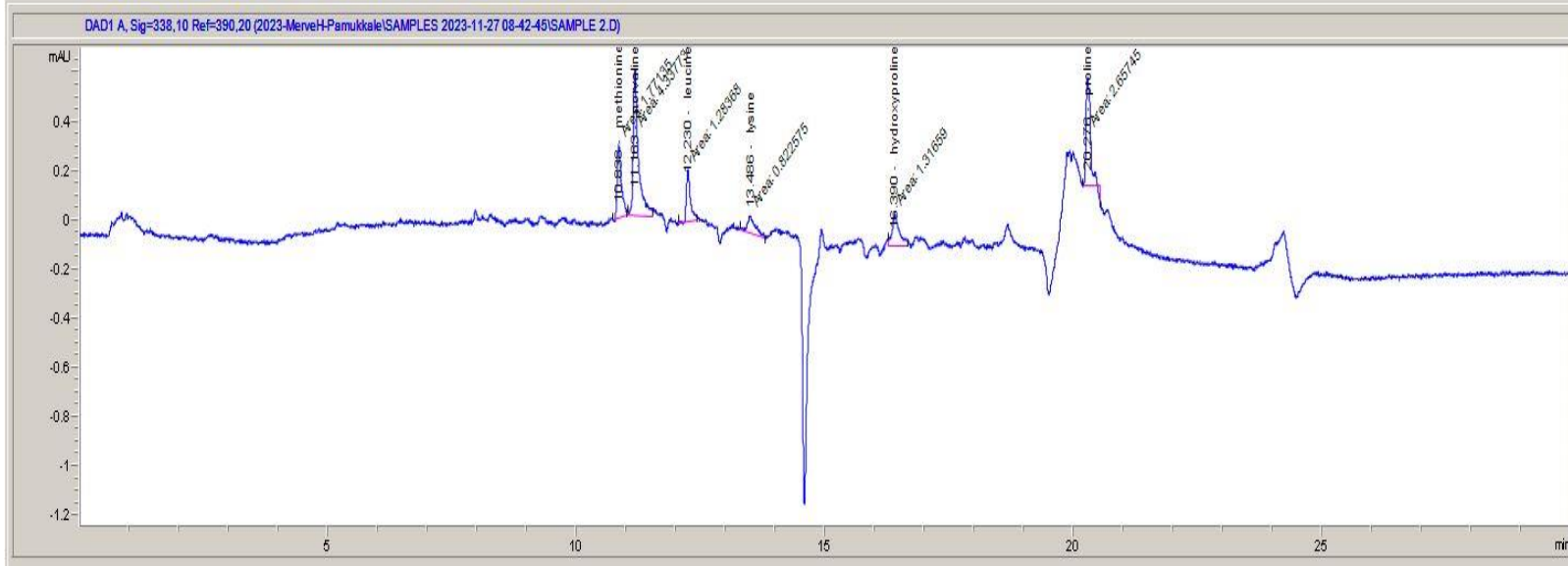
10. EKLER

EK A



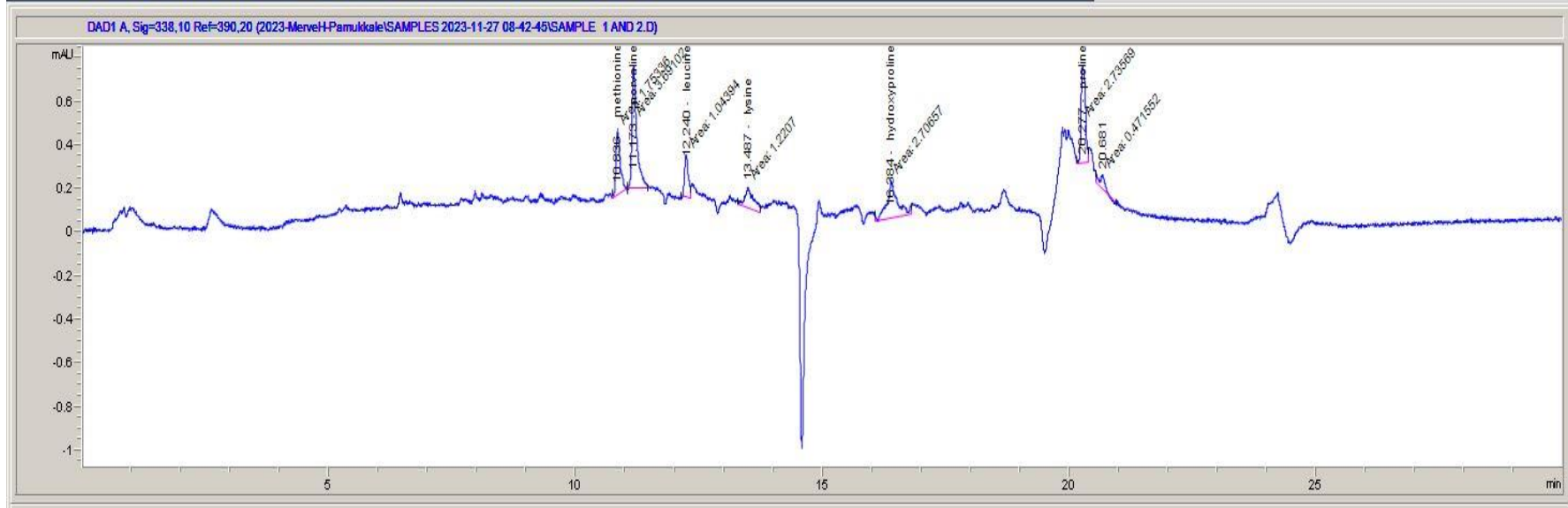
Şekil A.1: Örnek 1'in HPLC-DAD dedektör grafiği

EK B



Şekil B.1: Örnek 2'nin HPLC-DAD dedektör grafiği

EK C



Şekil C.1: Örnek (1 ve 2)'nin HPLC-DAD dedektör grafiği