

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

HAYVANSAL KAYNAKLI BİYOAKTİF PEPTİT İZOLASYONU VE SUCUK
KALİTESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Betül ARSLAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

HAYVANSAL KAYNAKLI BİYOAKTİF PEPTİT İZOLASYONU VE SUCUK KALİTESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Betül ARSLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayla SOYER

Çalışmada, sığır karaciğer hidrolizatlarının ve düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlarının biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri ile farklı peptit fraksiyonlarının sucuğun kalite özelliklerine etkileri araştırılmıştır. Karaciğerin Alkalaz:Protamex (1:1) ile hidrolizi ile hidrolizat, bu hidrolizatın ultrafiltrasyonu ile farklı moleküler büyüklükte peptit fraksiyonları (10 kDa ve 3 kDa) elde edilmiştir. Optimum hidroliz koşulları, 45°C'de 24 saat olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hidrolizatlar (%0.1, %0.3 ve %0.5) emülsifikasyon işlemi sonrası emülsiyon ve lipozomlara eklenmiş, 25°C'de 14 gün depolama süresince lipit dispersiyonlarının oksidatif ve fiziksel stabiliteleri araştırılmıştır. Depolama sırasında hidrolizat içermeyen emülsiyonlarda lipit oksidasyonu daha hızlı seyretmiştir. Faz ayrımı yalnızca kontrol grubunda 14. gün sonunda gözlemlenmiştir. Peptit fraksiyonları ise sucuğa iki farklı konsantrasyonda (%0.5 3P1, %0.5 10P1, ve %1 3P2, %1 10P2) ilave edilmiş ve kalite özellikleri üretim ve 90 gün depolama (4°C'de) süresince incelenmiştir. Peptitler (ilave edilen ve fermentasyonla oluşan) sucuktan ekstrakte edilmiş, eklenen peptitlerin stabilitesi araştırılmıştır. Sucukta 3 kDa peptitler, küf ve mayalara karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. En düşük seviyede protein ve lipit oksidasyonu 10P2'de belirlenmiştir. %1 oranında 10 kDa peptit eklenen sucuklardan ekstrakte edilen peptitler kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek radikal yakalama aktivitesi göstermiştir ve bu da depolama sırasında eklenen peptitlerin stabilitesini ortaya koymaktadır. Duyusal analizde en beğenilen grup 10P2 olmuştur. Sonuçlar, üretilen peptitlerin sucuğa ilavesinin antioksidan kapasiteyi artırmak ve ürün kalitesinin uzun süre muhafaza edilmesini sağlamak amacıyla uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Eylül 2023, 138 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif peptit, sucuk, antioksidan aktivite, mikrobiyal kalite, oksidasyon, duyusal

ABSTRACT

PhD Thesis

BIOACTIVE PEPTIDE ISOLATION FROM ANIMAL SOURCES AND THEIR EFFECTS ON QUALITY CHARACTERISTICS OF FERMENTED SAUSAGES

Betül ARSLAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ayla SOYER

Investigation of bioactive and functional properties of bovine liver hydrolysates (BLHs) and their low molecular weight of fractions was aimed. Mixed peptides were prepared from Alcalase:Protamex (1:1)-hydrolyzed (24 h) bovine liver, and two fractions (3 and 10 kDa) were obtained by ultrafiltration. Optimal conditions were identified as hydrolysis at 45°C for 24 h, resulting in the generation of BLHs and peptides with the highest antioxidant activity. BLHs at different concentrations (0.1%, 0.3%, and 0.5%) were added to emulsions after emulsification and to liposomes. The peptide fractions were applied in fermented sausage (with inoculated fermentation) at two different concentrations (0.5% and 1%). Stability of the systems was tested for 14 days of storage at 25°C. Quality characteristics of fermented sausages containing bioactive peptides (BPs) were examined during manufacturing, and 90 days of storage (at 4°C). Total peptides (added and fermentation-induced) were extracted from the sausages, and the stability of the added peptides was determined. Lipid oxidation occurred more rapidly in emulsions without BLH during the storage. Phase separation was observed only in lecithin emulsion without BLH after 14 days. 3 kDa peptides possessed inhibitory effect against molds and yeasts. 10P2 had the lowest protein and lipid oxidation rates. Peptides extracted from 10P2 had 2-fold higher radical scavenging activity than control, indicating the stability of the added peptides during the storage. In general, sensory score of 10P2 was the highest. The results suggested that the use of antioxidative peptides in fermented sausages is an applicable method to improve antioxidant capacity and product's quality in long term storage.

September 2023, 138 pages

Key Words: Bioactive peptide, fermented sausage, antioxidant activity, microbial quality, oxidation, sensory

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın en uzun ve zorlu süreci olan doktora tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, karşılaştığım her türlü zorlukta gece ya da gündüz demeden bana vakit ayıran, destek olan, bana olan inancımı hiç kaybetmeyen, bu yoğun çalışma döneminde hayatın renklerinin ve sağlığın değerinin de farkında olmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayla SOYER'e,

Tez çalışmasının başlangıcından itibaren dünyanın öteki ucundan bana yardımcı olan, tecrübesi ile yönlendiren, pandemi dönemindeki psikolojik savaşı yönetebilmemi sağlayan, her online görüşmemizde bana saatlerini ayıran, A.B.D.'nde araştırmacı olarak çalıştığım süreçte kişisel ve bilimsel gelişime katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Youling L. XIONG'a,

Tez çalışmasının tüm aşamalarını yakından takip eden ve yönlendiren, destek, bilgi ve tecrübeleri ile çalışmanın son şeklini almasına büyük katkı sağlayan TİK üyesi değerli hocalarıma, başta Sayın Prof. Dr. Nuray KOLSARICI olmak üzere Sayın Prof. Dr. Halil VURAL'a ve Sayın Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN'a,

Analizlerim süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN'a ve Sayın Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN'a, her ihtiyacım olduğunda bana zaman ayıran, sorularımı yanıtlayan ve laboratuvar olanaklarıyla da destek olan Sayın Doç. Dr. Eda DEMİROK SONCU'ya, araştırmada kullanılan karaciğer ve et temini için Sincan Et ve Süt Kombinasyonu yetkililerine ve özellikle Sayın Gıda Yük. Müh. Hazret ÖZDEMİR'e, Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ve Beycan AYHAN'a, laboratuvarı beni yalnız bırakmayan ve bu süreçte kendini bir hayli geliştirerek beni gururlandıran çok değerli öğrencim Önder ŞAHİN'e ve karnımızı doyuran biricik annesine,

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri, bana olan inançları ve sevgileriyle yanımda olan ve varlıklarıyla bana güç veren canım annem Ayşegül ARSLAN'a, babam Metin ARSLAN'a ve ablam Ayşenur ARSLAN'a,

Son olarak, hayatımın belki de en zor döneminde karşıma çıkıp her bir zorluğu benim için kolaylaştıran, sağlığımı, mutluluğumu ve geleceğimi emanet ettiğim ve aynı şekilde emanet bildiğim, gelecekteki eşim Ersan SOLMAZ'a sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 21H0443001 No'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmasının bir bölümü Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2214/A Doktora sırası yurtdışı araştırma burs programı kapsamında 1059B141900415 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Betül ARSLAN
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Biyoaktif Peptitler	4
2.2 Sucuk	8
2.3 Biyoaktif Peptit Üretiminde Protein Kaynaklarının Seçimi	10
2.4 Peptit Üretimi	11
2.4.1 Enzimatik hidroliz	11
2.4.2 Mikrobiyal fermentasyon	13
2.5 Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerin İncelenmesi	14
2.5.1 Antioksidan aktivite	15
2.5.2 Antimikrobiyal aktivite	18
2.6 Fonksiyonel Nitelikler ve Gıda Kalitesini Artırma Potansiyeli	20
2.7 Peptitlerin Gıda Üretim Proseslerine Karşı Stabilitesi	24
2.8 Potansiyel Riskler ve Güvenlik Değerlendirmesi	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Materyal	30
3.2 Sığır Karaciğerinden Hidrolizat Eldesi	31
3.3 Hidrolizat ve Peptit Fraksiyonlarında Yapılan Analizler	32
3.3.1 ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite analizi	32
3.3.2 FRAP yöntemi ile antioksidan aktivite analizi	32
3.3.3 Peptit konsantrasyonu analizi	33
3.3.4 SDS-PAGE analizi	33
3.4 Karaciğer Hidrolizatının Fonksiyonel Niteliğinin Belirlenmesi	33

3.4.1 Lipit dispersiyonlarında tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM) analizi	34
3.4.2 Lipit dispersiyonlarında konjuge dien analizi	35
3.4.3 Partikül boyutu	35
3.5 Sucuk Üretimi.....	35
3.5.1 Mikrobiyolojik analiz	36
3.5.2 Bileşim ve pH analizleri	37
3.5.3 Renk ölçümü	37
3.5.4 Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM) analizi	37
3.5.5 Toplam sülfidril analizi.....	38
3.5.6 SDS PAGE	38
3.5.7 Duyusal analiz	39
3.5.8 Peptit ekstraksiyonu.....	39
3.5.9 Sucuktan elde edilen peptit ekstraktında antioksidan aktivite analizi	39
3.5.10 Peptit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	40
3.5.11 SDS PAGE	40
3.6 İstatistik Analiz	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1 Sığır Karaciğerinde Enzimatik Hidroliz İşleminin Optimizasyonu.....	41
4.2 Karaciğer Hidrolizatının Fonksiyonel Özelliklerine Ait Lipit Dispersiyonlarında Yapılan Analiz Sonuçları	47
4.2.1 TBARM.....	48
4.2.2 Konjuge dien.....	52
4.2.3 Partikül boyutu	56
4.3 Biyoaktif Peptit İlavesinin Sucuğun Kalite Özelliklerine Etkisi.....	61
4.3.1 Mikrobiyolojik.....	62
4.3.2 Kimyasal bileşim	68
4.3.3 pH	71
4.3.4 Renk ölçümü	74
4.3.5 Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM)	79
4.3.6 Sülfidril	81
4.3.7 Miyofibriler proteinlerde SDS-PAGE	82
4.3.8 Duyusal	83
4.4 Peptit Ekstraktlarında Yürütülen Analiz Sonuçları.....	90

4.4.1 Antioksidan aktivite	90
4.4.2 Peptit konsantrasyonu.....	93
4.4.3 SDS-PAGE	95
5. SONUÇ.....	97
KAYNAKLAR	99
EKLER.....	115
EK 1 Çiğ Sucuk Duyusal Değerlendirme Formu	116
EK 2 Pişmiş Sucuk Duyusal Değerlendirme Formu	121
EK 3 Sucuktan elde edilen peptit ekstraktlarının ABTS, FRAP ve peptit konsantrasyonu sonuçlarına ait veriler	126
EK 4 Araştırma Verilerinin Varyans Analiz Sonuçları	127
ÖZGEÇMİŞ.....	136

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
CO ₂	Karbondioksit
FeSO ₄	Demir sülfat
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
Mg	Miligram
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Rcf	Relative Centrifugal Force
V	Volt

Kısaltmalar

ABTS	Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BP	Biyoaktif peptit
FDA	Food and Drug Administration)
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GRAS	Generally Recognized as Safe)
KH	Karaciğer hidrolizatı
KD	Konjuge dien
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
MA	Molekül ağırlığı
OPA	o-phytaldehyde
PBS	Phosphate buffer saline
PG	Propil galat
RYA	Radikal yakalama aktivitesi
S.	<i>Staphylococcus</i>
TBARM	Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi
TCA	Triklorasetik asit
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TBHQ	Tert-bütilhidrokinon
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyoaktif peptitlerin sağlık ve gıda kalitesi üzerine etkileri	6
Şekil 2.2 Protein hidrolizi sonucu peptitlerin özellikleri	12
Şekil 2.3 Et yan ürünlerinden ekstrakte edilen peptitlerin aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan antioksidan ve antimikrobiyal analiz yöntemleri	14
Şekil 2.4 Enzimatik protein hidrolizinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.5 Gıdalara uygulanan proseslerin matris içindeki peptitlerde meydana getirdiği yan zincir modifikasyonları.....	26
Şekil 4.1 3 kDa (I) ve 10 kDa (II) peptid fraksiyonlarında ve hidrolizatta (III) ABTS ve FRAP antioksidan aktivite analizleri için hidroliz süresine (X1: saat) karşı hidroliz sıcaklığının (X2: °C) 3D kontur grafikleri.....	42
Şekil 4.2 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğer hidrolizatlarında protein degradasyonunu gösteren SDS-PAGE görseli.....	47
Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim	49
Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim.	50
Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim.	51
Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween-20 emülsiyonlarının depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim.	53
Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim.	54
Şekil 4.8 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim.	55
Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween-20 emülsiyonlarının depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafığı) meydana gelen değişim.	57
Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafığı) meydana gelen değişim.	58

Şekil 4.11 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafiği) meydana gelen değişim.	60
Şekil 4.12 Emülsiyon ve lipozomların depolama süresince görünüşleri.....	61
Şekil 4.13 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların bileşim analizi sonuçları	70
Şekil 4.14 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda pH değerinde üretim süresince meydana gelen değişim.....	72
Şekil 4.15 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda pH değerinde depolama süresince meydana gelen değişim.....	73
Şekil 4.16 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların CIE* renk değerlerinde üretim süresince meydana gelen değişim	75
Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların CIE* renk değerlerinde üretim süresince meydana gelen değişim	77
Şekil 4.18 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklardan ekstrakte edilen miyofibriller proteinlerde protein degradasyonu.....	83
Şekil 4.19 Çiğ sucuklarda üretim sonunda (12. gün) duyu analizi puanları.....	84
Şekil 4.20 Pişmiş sucuklarda üretim sonunda (12. gün) duyu analizi puanları.....	86
Şekil 4.21 Çiğ sucuklarda depolama sonunda (102. gün) duyu analizi puanları.....	87
Şekil 4.22 Pişmiş sucuklarda depolama sonunda (102. gün) duyu analizi puanları	88
Şekil 4.23 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilave edilen çiğ sucuklar (12. gün)	90
Şekil 4.24 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince radikal yakalama aktivitesinde meydana gelen değişim.	91
Şekil 4.25 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince demir indirgeme gücünde meydana gelen değişim.	92
Şekil 4.26 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince peptit konsantrasyonlarında meydana gelen değişim.	94
Şekil 4.27 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklardan elde edilen peptit ekstraktlarında protein degradasyonu.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerin antioksidan aktivite, peptit konsantrasyonu ve protein miktarı sonuçları	44
Çizelge 4.2 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerden elde edilen 3 kDa molekül ağırlığında peptitlere ait antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu sonuçları.....	45
Çizelge 4.3 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerden elde edilen 10 kDa molekül ağırlığında peptitlere ait antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu değerleri	46
Çizelge 4.4 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesinin sucuklarda üretim süresince mikroorganizma sayıları üzerine etkisi (log kob/g)	63
Çizelge 4.5 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesinin sucuklarda depolama süresince mikroorganizma sayıları üzerine etkisi (log kob/g)	67
Çizelge 4.6 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda üretim sırasında pH değerleri.....	71
Çizelge 4.7 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda depolama sırasında pH değerleri.....	72
Çizelge 4.8 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda üretim sırasında CIE* renk değerleri	74
Çizelge 4.9 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda depolama sırasında CIE* renk değerleri	76
Çizelge 4.10 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda TBARM değerinde (mg MDA/kg) üretim süresince meydana gelen değişim	79
Çizelge 4.11 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda TBARM değerinde depolama süresince meydana gelen değişim	80
Çizelge 4.12 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda sülfidril miktarında (nmol sülfidril/mg protein) üretim süresince meydana gelen değişim.....	81
Çizelge 4.13 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda sülfidril miktarında depolama süresince meydana gelen değişim	82
Çizelge 4.14 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen çiğ ve pişmiş sucuklarda üretim sonunda belirlenen duyusal değerlendirme puanları .	85
Çizelge 4.15 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen çiğ ve pişmiş sucuklarda depolama sonunda belirlenen duyusal değerlendirme puanları	88

1. GİRİŞ

Nüfustaki küresel artış, insan vücudundakilere benzeyen amino asitlerin ayırt edici içeriği nedeniyle et proteini başta olmak üzere gıda tüketimini artırmaktadır (Baldi ve Gottardo 2017, Xiong 2004). Son 20 yılda insan beslenmesinde proteinlerin önemi bu konuda yapılan çalışmaların da artmasıyla giderek önem kazanmıştır. Bu nedenle piyasa, tüketicilerin hem ekonomik durumundan hem de beslenme alışkanlıklarından etkilenmektedir. Tüketicilerin et ve et ürünlerine olan talebinin on yılda %14 artması beklenmekte, bu da et endüstrisinin daha fazla sayıda besi hayvanını ete dönüştürmeye ve sonuç olarak daha fazla yan ürün ve atık hacmi üretmeye yöneleceği anlamına gelmektedir (Alao vd. 2017). Kesimden sonra ortaya çıkan yan ürün miktarına ilişkin veriler canlı ağırlığın yaklaşık %66'sını oluştururken, gelişmiş ülkelerde verim canlı ağırlığın sadece %10-15'i kadardır (Limenih vd. 2022). Bu durumda, yüksek besin değerlerine rağmen önemli miktarda yan ürün yeterince kullanılmamaktadır. Bu yüksek kaliteli protein kaynaklarının imha edilmesinden kaynaklanan yüksek maliyet ve çevre kirliliği, endüstrinin sürdürülebilir uygulamalara yönelimini teşvik etmiştir (Hübel ve Schaltegger 2022, Martínez-Alvarez vd. 2015). Yan ürünlerin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi, ekonomik ve çevresel sorunların ötesinde, artan nüfusa karşılık protein talebindeki artışı karşılamak ve yetersiz beslenme sorununa çözüm üretmek için ideal bir yöntemdir (Adesogan vd. 2020, Aspevik vd. 2018)

İnsanların çoğu, sağlık üzerindeki etkileri, farklı beslenme alışkanlıkları ve kültürel geçmişleri ile ilgili endişeleri olduğu için yenilebilir yan ürünlerin doğrudan tüketiminden kaçınmaktadır (Alao vd. 2017). Buna karşılık, yan ürünlerin piyasa kârlılıklarının düşmesi ve bunun sonucunda düşük fiyat politikası kaçınılmazdır. Öte yandan, yan ürünler, doğru kullanıldığında katma değerli ürünler üretmek için kullanılacak yüksek kaliteli proteinler açısından zengindir. Bu proteinlerin parçalanması, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen peptitler oluşur. Peptitlerin gıda ürünlerine dahil edilmesi, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle raf ömrünün uzamasını ve yüzey aktif özellikleri ile tekstürün iyileştirilmesini sağlar (Jayathilakan vd. 2012, Toldrá vd. 2016). Dolayısıyla, yan ürünlerin bunlarla üretilen yem ve evcil hayvan gıdalarından daha

yüksek pazarlama değerine sahip olabilecek biyoaktif bileşenlere dönüştürülmesi, gıda şirketlerine döngüsel bir ekonominin gelişmesi için bir fırsat sunmaktadır.

Et ve et ürünleri biyolojik olarak kullanılabilir protein, vitamin ve mineralleri içermesi nedeniyle besleyici değeri yüksek gıdalardır. Ancak, etin işlenmesi, depolanması ve pişirilmesi sırasında oluşan bazı bileşikler etin veya et ürününün Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından karsinojen (grup 1A) olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur. Araştırmacılar işlenmiş et ürünlerinin sağlığa zararlı olarak nitelendirilmesinin başlıca sebepleri arasında, N-nitrozo bileşiklerin, polisiklik aromatik hidrokarbonların, heterosiklik aromatik aminlerin ve lipid oksidasyon ürünlerinin yer aldığını ileri sürmektedirler (Turesky 2018). Et ve et ürünlerinde oksidasyon, lipidleri, proteinleri ve et pigmentlerini etkilemekte, bu şekilde üründe renk, tekstür, aroma ve besin değerinde kayıplara neden olmaktadır (Lorenzo vd. 2018). Sentetik antioksidanların gıdalarda kullanılması oksidasyon reaksiyonlarını geciktirmektedir. Ancak, doğal antioksidanlara kıyasla daha ucuz ve etkili olmasına rağmen karsinojenik olmaları nedeniyle gıdalarda kullanımını sınırlıdır (Hernández-Ledesma vd. 2011).

Sığır kıyması, köfte, taze et ve sosis gibi çeşitli et ürünlerine hidrolizat veya peptit fraksiyonu ilave edilerek ürün rengi, lipid oksidasyonu, mikrobiyal kalite ve duyu özellikleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalara literatürde yer verilmiştir (Bougatef vd. 2018, Penã-Ramos ve Xiong, Przybylski vd. 2016, Wang ve Xiong 2005, Wang vd. 2021, Zhang vd. 2010). Ayrıca, fermentasyon süresince biyoaktif peptit oluşumu ve oluşan peptitlerin biyoaktif nitelikleri ortaya konulmuştur (Gallego vd. 2018, Mora vd. 2015, Toldrá vd. 2018). Et fermentasyonu, mikroorganizmaların faaliyeti sonucu ürünün güvenliğine katkıda bulunmasının yanı sıra bir dizi fiziksel ve biyokimyasal reaksiyonu beraberinde getirir. Oluşan uçucu ve uçucu olmayan bileşikler ise ürünün tipik aroması ve besin değerinden sorumludur (Sharma vd. 2020). Fermente et ürünleri arasında sucuk, özellikle ülkemizde üretilen ve karakteristik aromasıyla öne çıkan bir yarı-kuru fermente et ürünüdür. Geleneksel sucuk üretimi doğal floranın etkisiyle gerçekleşebildiği gibi, endüstriyel olarak ticari kültürlerin uygulanmasıyla da gerçekleştirilebilmektedir (Kaban 2013). Ancak, fermentasyon etkisiyle biyoaktif peptit oluşumunun ürüne ayrıca yapılan peptit ilavesinden nasıl etkileneceği, ya da ilave edilen peptitlerin fermente bir et

ürününde ve kompleks bir gıda matrisi içerisinde stabilitesinin nasıl değişeceği bilinmemektedir.

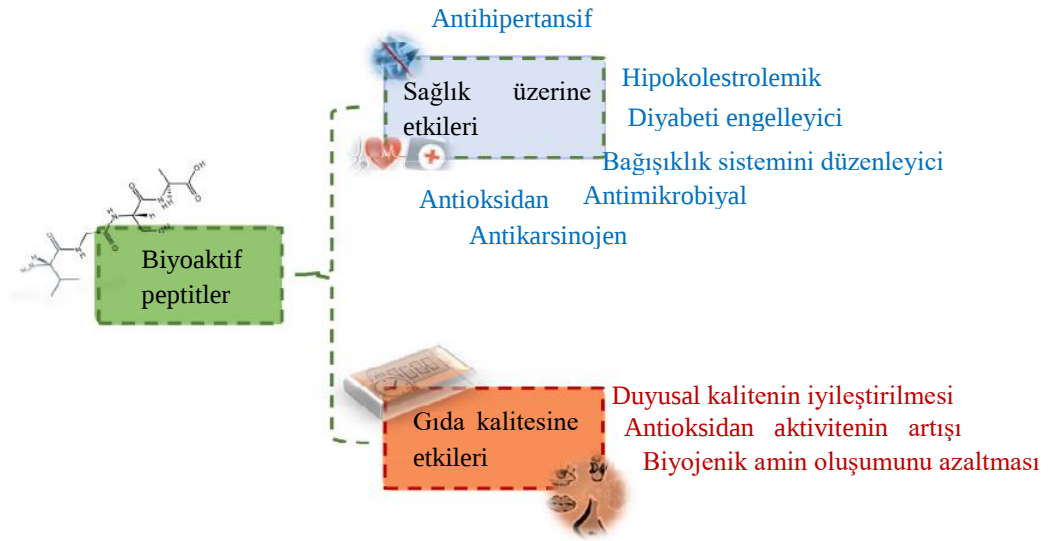
Sığır karaciğerinden elde edilen hidrolizatların fonksiyonel özelliklerinin araştırıldığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Araştırmacılar peptitlerin biyoaktif niteliklerinin korunabilmesi amacıyla emülsiyon ve lipozom gibi çeşitli taşıyıcı sistemlerin kullanılabileceğini bildirmektedir (Yekta vd. 2020). Ancak, öncesinde bu sistemlerle taşınması hedeflenen peptitlerin sistem içerisinde hedeflenen biyoaktif özelliğini sürdürebildiğinin belirlenmesi gerekir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların geniş kapsamlı olmadığı görülmektedir. Peptit fraksiyonlarının fazla miktarda üretimi ve ilave edildiği ürünün kalite niteliklerinin tüm yönleriyle ortaya konulması fazla zaman ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu kapsamda, karaciğerden üretilen hidrolizat ve peptitlerin biyoaktif ve fonksiyonel niteliğinin araştırılması, sucuğa ilave edilen peptitlerin ürün özelliklerine etkilerinin belirlenmesi, üretim ve depolama süresince sucukta peptit ekstraksiyonu gerçekleştirerek ekstrakte edilen peptitlerin antioksidan aktiviteleri ve uğradıkları değişimleri ile fermantasyon süresince yeni peptit oluşumu arasındaki ilişkisinin belirlenmesi, ilave edilen peptitlerin stabilitelerinin araştırılması planlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif peptitler (BP), çok sayıda bitkisel ve hayvansal protein kaynağından üretilmektedir. Üretilen peptitlerin biyoaktif niteliği üretim yöntemi ve protein kaynağı ile doğrudan ilişkilidir (Samaranayaka ve Li-Chan 2011). Biyoaktif peptitlerin genel olarak 2 ila 20, bazı kaynaklara göre 30 amino asitten meydana geldiği bilinmektedir (Ovando vd. 2018). Bu peptitler ana protein yapısında aktif olmamakla birlikte protein kaynağının ekzojen ya da endojen enzimler vasıtasıyla degradasyonu sonucu biyoaktif özellik kazanırlar (Korhonen ve Pihlanto 2006). Enzimatik hidroliz BP üretiminde yaygın olarak yararlanılan yöntemler arasında yer alırken, çeşitli gıda işleme yöntemleri, mikrobiyal fermentasyon, gıda proteinlerinin gastro-intestinal sindirimi ve karkasta post-mortem süreçte ve olgunlaştırma sırasında da farklı özelliklere sahip peptitlerin oluştuğu bilinmektedir (Lafarga ve Hayes 2014). Biyoaktif peptitler kimyasal yolla da sentezlenebilmekte ve farmasötik alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu peptitler, proteinlerin kasta yer alan endojen enzimler tarafından ette/et ürününde ya da gıdalar tüketildiğinde midede sindirime uğratılması sonucu doğal olarak da meydana gelmektedir. Bu peptitler ayrıca yer fıstığı çekirdekleri, pirinç kepeği, ayçiçeği, yonca yaprağı, mısır glütenu, yumurta sarısı, süt, kefir, soya fasulyesi ve hayvansal ürünler (sığır, kanatlı ve su ürünleri etleri ve yan ürünleri) gibi protein içeren çok sayıda gıdadan da elde edilebilirler (Lorenzo vd. 2018, Sarmadi ve Ismail 2010). Söz konusu kaynaklardan enzimatik hidroliz yoluyla veya fermentasyon sırasında mikrobiyal enzimler tarafından gerçekleştirilen proteoliz reaksiyonları biyoaktif peptit oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Fermente sosislerde protein degradasyonu sonucu meydana gelen peptitler ve serbest amino asitler ürün lezzetini arttırmakta ve ürünü fizyolojik olarak daha faydalı hale getirmektedir. Bu noktada, kullanılan starter kültür etkin rol oynamaktadır. Bazı laktik asit bakterileri yüksek proteolitik aktivite göstermekte ve düşük molekül ağırlıklı peptitleri meydana getirmektedir. Kısa zincir uzunluğundaki peptitler daha yüksek biyoaktiviteye sahiptir (Fadda vd. 2010).

Gıda kaynaklarından elde edilen biyoaktif peptitlerin geniş bir aktivite spektrumu tanımlanmıştır; bunlar arasında antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, antihipertansif, anti karsinojen, gibi etkilerinin yanı sıra kardiyovasküler, bağışıklık, sinir ve sindirim sistemleri üzerinde de olumlu etki göstermesi yer almaktadır (şekil 2.1). Bazı peptitler birden fazla etki gösterebilme yeteneğine sahip olabilirler. BP üretiminde yararlanılan protein kaynakları arasında et proteinin, antioksidan ve antimikrobiyal peptit üretimi için iyi bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Bah vd. 2013). Çünkü et proteinleri, bitkisel proteinlerde genellikle bulunmayan metil histidin ve hidrokسيمetilis in gibi temel amino asitleri yüksek düzeyde içermektedir (Liu vd. 2018). Et, iç organ ya da mezbaha artıklarından elde edilen protein kaynaklı hidrolizatların yüksek oranda biyoaktif peptit içerdiği, özellikle düşük molekül ağırlığına sahip (<3 kDa) peptit fraksiyonlarının antioksidan aktivitelerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca et, balık ve jelatinden elde edilen protein hidrolizatlarının acı (bitter) tat oluşturma potansiyelinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Bhat vd. 2015). Bu kapsamda, organ etleri ve mezbaha artıklarının gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmasının avantaj sağlayacağı açıktır (Centenaro vd. 2014, Damgaard vd. 2015). Ülkemizde karaciğer, beğenilerek tüketilen bir gıda olmasına karşın, canlı dokuda sığır etine kıyasla 3-5 kat daha fazla kolesterol içermesi nedeniyle diyet listelerinde yer almayan bir gıdadır. Ayrıca karaciğer, ilaç kalıntıları ve toksik ağır metalleri içerebilmektedir. Rizzetti vd. (2017), sığır böbrek ve karaciğerinin yüksek oranda veteriner ilaç kalıntısı içeren organlar olduğunu bildirmiştir. Belirtilen sebepler nedeniyle, Amerika Birleşik Devletleri'nde, sağlık üzerine olumsuz etkileri olması nedeniyle organ etlerinin tüketimi ile ilgili sınırlamalar getirilmiştir (Jayathilakan vd. 2012). Asya ülkelerinde de organ etlerinin sağlığa olumsuz etkileri nedeniyle gıda endüstrisi dışında (hayvan yemi, ilaç ve kozmetik sanayi) kullanılmasına yönelik yasal düzenlemeler olduğu rapor edilmiştir (Rahman vd. 2014). Bu nedenle karaciğerden fonksiyonel bir katkı maddesi üretilmesi, ürüne katma değer katarak farklı bir pazar oluşmasına neden olacaktır. Bu kaynaklardan elde edilen peptitlerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan özellik göstermeleri, katma-değerli ürün üretimine ilaveten gıda kalitesinin uzun süre muhafaza edilmesi ve raf ömrünün uzatılması açısından önemlidir.



Şekil 2.1 Biyoaktif peptitlerin sağlık ve gıda kalitesi üzerine etkileri (Lorenzo vd. 2018)

Proteoliz, et ve et ürünlerinin olgunlaştırılması sırasında temel mekanizmayı oluşturan etkendir. Başta katepsinler olmak üzere kasta yer alan proteinazlar proteinlerin yıkımından sorumludur. Sonuç olarak farklı büyüklükte çok sayıda farklı molekül ağırlığında peptitler (özellikle küçük peptitler) (Mora vd. 2009, Sentandreu vd. 2002) ve serbest amino asitler (Toldra vd. 2000) meydana gelir. Laktik asit bakterilerinin faaliyeti ile oluşan bu bileşikler ürün lezzetine katkı sağlamakta, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri ile ürün kalitesini ve sağlığı olumlu yönde etkilemektedir (Toldrá vd. 2018). Peptitlerin biyoaktif özellikleri elde edildikleri kaynak, N- ve C-terminalde bulunan amino asit çeşidi, amino asit dizilimi, gıda üretim prosesi gibi faktörlerden etkilenmektedir. Kükürt içeren amino asitler hücresel fonksiyonlar ve sağlık yönünden ele alındığında önemli etkiye sahip olmalarının yanı sıra kelatlaşma özelliği ile ağır metalleri bağlayarak antioksidan etki göstermektedir (Colovic vd. 2018). R grubunda sülfidril içeren peptitler yüksek radikal söndürme kapasitesine sahiptir (Liu vd. 2016). Antimikrobiyal özellik gösteren peptitlerin çoğunlukla kısa zincirli katyonik peptitler olduğu ve genellikle molekül ağırlıkları 10 kDa'un altında, 50'den daha az amino asit içeren ve içerdiği amino asitlerin %50'ye yakınının hidrofobik özellikte olduğu belirtilmektedir (Najafian ve Babji 2012, Zambrowicz vd. 2013). Antimikrobiyal peptitlerin Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler, mikrobakteriler, virüsler ve küfller üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (Bhat vd. 2015, Song vd. 2012). Hayvansal kaynaklı biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal etkileri farklı mekanizmalarla olmaktadır. Bu konuda önerilen başlıca mekanizmalar; hücre membranına bağlanarak membran geçirgenliğini

bozarak ya da başlıca hücrel yapıların çalışma düzenini bozarak olmaktadır (Albenzio vd. 2017, Lafarga ve Hayes 2014). Jang vd. (2008), sığır etinden elde ettiği peptit hidrolizatlarının *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* üzerine antimikrobiyal etkilerini ortaya koymuşlardır. Fermente sosislerde biyoaktif peptit oluşumu ürün güvenliğinin artırılması ve raf ömrünün uzatılması, karakteristik lezzet oluşumu ve sağlık üzerine olumlu etki sağlamaktadır. Geleneksel bir ürün olan sucukta da söz konusu etkileri ortaya çıkaracak kültürlerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar *Lactobacillus* türlerinin daha yüksek proteolitik faaliyet gösterdiğini, özellikle lezzet üzerine etkili amino asitlerin oluşmasını sağlayacak peptidaz aktivitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca in vitro çalışmalar laktik asit bakterilerinin sarkoplazmik proteinlerin hidrolizinde daha etkili olduğunu, miyofibriler proteinlerin degradasyonunda da etkili olduğunu, pH'daki azalmaya bağlı olarak endojen enzimlerin faaliyet göstermesi sonucu proteolizin (özellikle uzun süreli olgunlaştırılan et ürünlerinde) biyoaktif peptitlerin oluşumu ile sonuçlandığını bildirmiştir (Fadda vd. 2010, Vaştag vd. 2010).

Araştırmacılar, olumlu etkilerinin yanında biyoaktif peptitlerin toksisite, alerjenite ve bitter tat oluşturma potansiyeli olduğunu da bildirmişlerdir. Toksik özellikteki peptitler histidin, prolin ve asparajin amino asitlerini fazla miktarda içerirler. Toksik olmayan peptitlerde ise valin, arginin, treonin, glutamin, metiyonin, lösin, lisin, izolösin, fenilalanin ve alanin amino asitlerinin miktarı fazladır. Lösin, tirozin, fenilalanin amino asitleri ve L dizilimindeki hidrofobik amino asitler C-terminal uğta yer aldığında peptidin bitter özellik gösterme ihtimalinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Lafarga vd. 2017). Bir başka kaynakta ise hidrofobik amino asitlerin N- veya C- terminal uçlarda bulunmayıp zincir içerisinde bulunması durumunda bitter özellikte artış görüldüğü belirtilmiştir (Hajfathalian vd. 2019). Özellikle düşük molekül ağırlığında peptitlerin (<6 kDa) ürün kalitesini ve sağlığı olumsuz etkileyebileceği göz önünde bulundurularak, sucuk üretiminde kullanılacak kültürlerin protein degradasyonundaki rolünün net bir şekilde anlaşılması gerekmektedir

Enzimatik hidroliz, BP üretiminde mikrobiyal fermantasyon ile kıyaslandığında üretilen peptitlerin beklentiyi karşılayacak biyoaktif niteliğe sahip olması bakımından daha avantajlı bir yöntemdir (Cruz-Casas vd. 2021, Najafian ve Babji 2014). Hidrolizde amaçlanan biyoaktif bileşiklerin oluşumunu sağlayacak uygun bir enzim veya enzim kombinasyonlarının kullanılması, peptit bağlarının kırılması için yüksek özgünlük, tekrarlanabilirlik ve üretilen peptitlerin tahmin edilebilirliği gibi avantajlar sunar (Tavano 2013). Hidroliz koşulları, kullanılan enzim türü, peptitlerin dizilimi ve konfigürasyonu ile amino asit bileşimi, peptitlerin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri ile yakından ilişkilidir (Borrajo vd. 2020). Gıdalara ilave edilecek peptitlerin proses koşullarına karşı stabilitesi ve gıda matrisi ile reaksiyona girme potansiyeli (Sun ve Udenigwe 2020), toksisitesi ve bitter tat oluşturma potansiyeli (Lafarga ve Hayes 2017), tüketim sonrası biyoyararlılığı (Yin vd. 2020), üretilen gıdanın kalite özellikleri ve fonksiyonel olarak tanımlanabilmesi bakımından önem arz etmektedir.

2.2 Sucuk

Et fermantasyonu, gıda muhafaza yöntemi olarak ortaya çıkmış ve ürün çeşitliliğini artırmayı amaçlayan bir işleme tekniği olarak değişime uğramıştır. Günümüzde, dünyanın farklı bölgelerinde fermantasyon ile üretilen et ürünleri için çeşitli formülasyonlar ve üretim teknikleri geliştirilmiştir. Bölgesel farklılıklardan bağımsız olarak, fermente etler temel ve fonksiyonel besin maddeleri için önemli kaynaklar olarak kabul edilir. Ancak yüzyıllar boyunca, tüketicilerin güvenlik konularına ilişkin endişeleri nedeniyle bu ürünlerin faydaları tehlikeye girmiştir (Leroy vd. 2013). Güvenlik ve sağlık yönünden sadece yağ, tuz, nitrat/nitrit içeriği gibi iyi bilinen tehditleri değil, aynı zamanda teknolojik bir sürecin bir adımından veya kontrolsüz fermantasyondan kaynaklanan biyolojik ve kimyasal tehlikeleri de içerebilir (Carballo 2021, Halagarda ve Wójciak 2022). Fermente et ürünlerine ilişkin ortaya çıkan olumsuz algıların çözümü olarak, tüketici tercihlerinin değerlendirilmesi temel öneme sahiptir. Bu nedenle, araştırmacılar tüketicilerin satın alma alışkanlıklarını etkileyen dışsal (sürdürülebilirlik, ekolojik etki, hayvan refahı ve fiyat) ve içsel faktörleri (duyusal kalite, raf ömrü ve kullanılabilirlik) dikkate alarak daha sağlıklı et ürünleri üretmeye odaklanmaktadır. Bu ürünlerin olumsuz etkileri bilinse de tüketiciler kültürleri ve bölgeleri temsil ettikleri için

geleneksel et ürünleri önemli yere sahiptir. Özellikle yeniden formüle edilmiş ve/veya yenilikçi fermente et ürünleri, sağlık üzerindeki etkilerinin yanı sıra besin değeri ve duyuşal özellikleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir (de Araújo vd. 2022).

Sucuk gibi geleneksel fermente et ürünleri Avrupa’da olduğu gibi ülkemizde de sevilerek tüketilmektedir. Bu ürünler, kullanılan et materyali, formülasyon, işleme koşulları ve kullanılan starter kültüre bağılı olarak farklı şekillerde üretilebilmektedir. Ülkemizde ise sucuk, fermentasyon ve kuruma prosesleri sonucu olgunlaşarak tüketime hazır hale gelen geleneksel fermente bir et ürünüdür. Ülkemizde fermente et ürünleri nem içeriklerine göre yüksek nemli (%50-60), orta nemli (%35-50) ve kuru (%20-35) sucuklar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Kaban ve Kaya 2008). Geleneksel sucuk, işleme koşullarına göre yarı-kuru ya da kuru olarak üretilmektedir. Geleneksel üretimde başlıca prosesler fermentasyon ve kurumdur ve ısıt işlemleri ve/veya dumanlama işlemi yer almamaktadır (Kaban 2013, Soyer vd. 2005). Diğer yandan yaklaşık 40 yıldır, kısa fermentasyon işlemini takiben ısıt işlemleri uygulanarak üretilen “ısıt işlemleri görmüş” ürünler de yaygın bir şekilde üretilmektedir. Bu ürünler, nem içerikleri yüksek (en fazla %50 nem) ürünlerdir ve üretim süresi kısa olduğundan geleneksel sucuklardan daha ucuza satılmaktadırlar. Kısa fermentasyon ve kuruma süresi nedeniyle ısıt işlemleri görmüş sucuklar geleneksel sucuklar gibi keskin ve tipik tat ve aromaya sahip değildirler (Kaban 2013, Soyer vd. 2005). Bu yetersiz tat ve aroma gelişimini ortadan kaldırmak için hızlı fermentasyon yapan starter kültürler kullanılmakta, fakat bu organizmalar asitliği kısa sürede düşürmek dışında proteolitik/lipolitik etkilerini gösterememektedirler ve ısıt işlemleriyle sayıları önemli ölçüde azaldığı için de tipik tat ve koku gelişimi sağlanamamaktadır (Soyer vd. 2005)

Fermente et ürünlerinde son ürünün karakteristik tat ve aroması, olgunlaşma sırasında belirli bağılı nem ve sıcaklıkta et formülasyonunda meydana gelen kompleks biyokimyasal, mikrobiyal, fiziksel ve duyuşal değişiklikler sonucunda oluşmaktadır (Dalmiş ve Soyer 2008). Son ürünün duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişim protein, lipid ve karbonhidratların kasta yer alan enzimler ile mikrobiyal enzimler tarafından yıkımı sonucu meydana gelmektedir (Ordóñez vd. 1999). Fermentasyonda starter kültürlerin kullanılması ürünü daha güvenli hale getirmekte ve arzu edilir

teknolojik özelliklerin oluşmasını sağlamaktadır. Starter kültürler fermantatif etkilerinin yanı sıra sahip oldukları proteolitik etkileri nedeniyle biyoaktif peptit oluşturma kabiliyetleri olan saf kültürlerdir ve bu etkileri olgunlaşma sürecinde ortaya çıkmaktadır. Kullanılan starter kültür seçimi asidifikasyon, denitrifikasyon prosesleri ile lipoliz ve proteoliz reaksiyonlarını ve nihayetinde ürünün duyu özelliklerini etkilemektedir. Örneğin, *Staphylococcus carnosus* ve *Staphylococcus xylosus* türleri peptitleri spesifik olarak parçalamakta, yağ asitlerini okside etmekte ve daha lezzetli ürün elde edilmesini sağlamaktadır (Gallego vd. 2018). Feng vd. (2014) uzun süreli olgunlaştırma ile üretilen sosislerin maliyetinin yüksek olması nedeniyle ürüne flavorizm enzimi ilave ederek proteolitik reaksiyonları hızlandırmayı hedeflemişlerdir. Üründe peptit ekstraksiyonu gerçekleştirmiş ve enzim ilavesi ile üretilen sosislerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Protein degradasyonunu arttırmaya yönelik gerçekleştirilen bu çalışmanın daha iyi kalitede sosis üretimi ile sonuçlanmasına rağmen ürüne enzim ilavesi belli bir maliyeti de beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak, enzimatik olmayan hidroliz yöntemlerinin araştırılması, hedefe daha düşük maliyetle ulaşılmasını sağlayacak bir uygulamadır (Lafarga vd. 2017).

2.3 Biyoaktif Peptit Üretiminde Protein Kaynaklarının Seçimi

Gıdalara ilave edilecek peptitlerin üretiminde yararlanılacak protein kaynağının seçimi, peptitlerin hedeflenen aktiviteleri, işleme uygunluğuna ya da dayanıklılığına ve nihai ürün özelliklerine dayanır. Bu doğrultuda, proteinlerin amino asit bileşimi, yapısı ve fonksiyonel gruplarının varlığı önemlidir. Biyoaktif peptitler, çeşitli maddelerden gelen proteinlerin parçalanma ürünleridir. Birçok çalışma, biyoaktif peptitlerin bitkilerden (Ghribi vd. 2015, Girgih vd. 2011, Jamdar vd. 2010, Pownall vd. 2010), etten (Escudero vd. 2012, Fu vd. 2017, Mora vd. 2016, Ryder vd. 2016), et yan ürünlerinden (Bah vd. 2016, Damgaard vd. 2015, Di Bernardini vd. 2011, Wei ve Chiang 2009), deniz ürünlerinden (Ennaas vd. 2015, Sila ve Bougatef 2016) ve süt ürünlerinden (Sah vd. 2018, Zanutto-Elgui vd. 2019) elde edilebileceğini göstermiştir. Bu kaynaklar arasında, hayvansal kökenli proteinler yüksek düzeyde elzem amino asit içeriğine sahiptir ve daha yüksek sindirim oranına sahiptir (Day 2013, Liu vd. 2016). Deniz kaynaklarından ve hayvansal yan ürünlerden gelen bazı protein hidrolizatlarının antimikrobiyal ve

antioksidan peptitler içerdiği kanıtlanmıştır (Bougatef vd. 2018, Toldrá vd. 2012). Hidroliz yoluyla peptit üretiminde enzim seçimi ve hidroliz koşulları, fermentasyon etkisi ile peptit üretiminde ise fermentasyon koşulları ve starter kültür kullanımı üretilen peptitlerin biyoaktivitesini etkileyen önemli faktörlerdir.

2.4 Peptit Üretimi

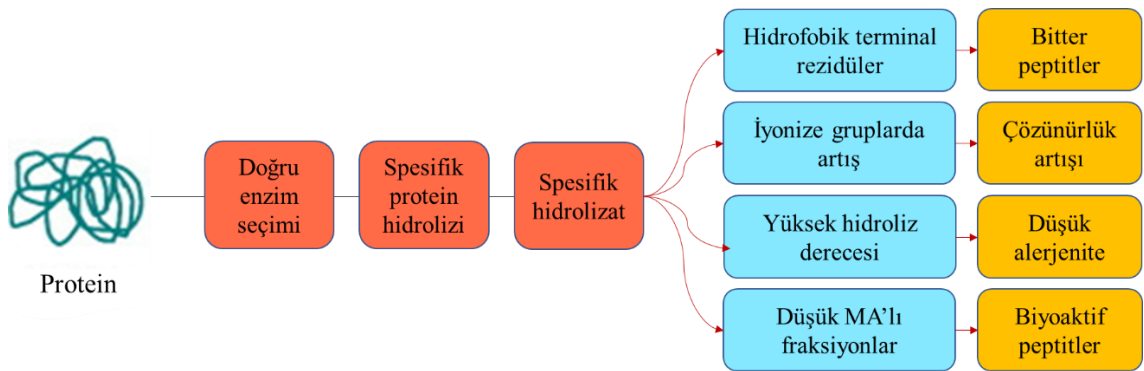
2.4.1 Enzimatik hidroliz

Hidroliz işleminde, substrat uygun bir enzimle optimum sıcaklık ve pH'da belirli süre muamele edilir. Peptit kaynağı olarak kullanılacak gıda, yapısında protein dışında farklı bileşikler de barındırdığı için öncesinde bir ayırma işlemine tabi tutulmalıdır. Ticari enzimler kullanarak protein moleküllerinin hidrolizi, reaksiyon süresinin kısa, elde edilecek peptitlerin miktar ve biyoaktivitelerinin tahmin edilebilir olması nedenleriyle mikrobiyal fermentasyona tercih edilebilir, yaygın ve güvenilir bir yöntemdir (Daliri vd. 2017). Bu amaçla uygulanan enzimler hayvan dokularından (pepsin, tripsin, alfa-kimotripsin), bitkilerden (papain, fisin, bromelain) ve mikrobiyal kaynaklardan (alkalaz, protamex, flavourzyme, neutrase, proteinaz K, termolisin, pronaz E) elde edilebilir (Albenzio vd. 2017, Choi vd. 2012, Najafian ve Babji 2014, Udenigwe vd. 2013). Biyoaktif peptit üretiminde mikrobiyal proteazlar düşük maliyetli ve yüksek peptit verimine sahip olmaları nedeniyle avantaj sağlamaktadır (Hernández-Ledesma vd. 2011).

Hidroliz işleminin etkinliği proteaz ve substrat çeşidinden önemli düzeyde etkilenir. Çünkü peptit zincirinin kırılma noktaları amino asit dizilimini, dolayısıyla biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri etkiler (Hajfathalian vd. 2018, Hajirostamloo 2010). Endopeptidazlar (örneğin tripsin, pankreatin, termolizin, pepsin, bromelain, papain) amino asit zincirinin uçlarına uzak yerleşim gösteren peptit bağlarını parçalarlar (terminal olmayan amino asitler üzerinde etki ederler) (Ellis 2019, Yamamoto vd. 2005). Buna karşılık, ekzopeptidazlar polipeptid zincirlerinin N-terminalinde (aminopeptidazlar) veya C-terminalinde (karboksipeptidazlar) etki gösterirler (Nchienzia vd. 2010). Endopeptidazlarla gerçekleştirilen hidroliz işleminde proteinlerin polipeptitlere dönüştürülmesi et ürünlerinde daha iyi bir tekstür sağlarken, düşük molekül ağırlığında

peptit üretiminden sorumlu olmaları nedeniyle biyoaktif özelliklerin gelişimi daha çok ekzopeptidazlardan kaynaklanır. Ancak, ekzo-peptidaz grubunda yer alan enzimlerin serbest amino asit miktarını artıracığı unutulmamalıdır (Toldrá vd. 2018).

Enzimatik hidroliz işleminin avantajları arasında, yan reaksiyonları önlemesi ve protein kaynağının besin değerini etkilememesi yer almaktadır (şekil 2.2). Ayrıca, enzimlerin özgünlükleri yüksek olduğu için, kimyasal ve besinsel özellikler daha iyi tanımlanmış protein hidrolizatlarının geliştirilmesine izin verir. Yöntem sayesinde proteinlerin alerjen özelliklerinin azalması sağlanır. Ancak, peptit bağlarının parçalanması ile serbest amino ve karboksil gruplarının miktarını artırarak çözünürlüğü artırır. Bu nedenle, hidroliz işlemi hidrofobik özelliğin artmasına veya azalmasına neden olabilir. Bu durum büyük ölçüde öncü proteinin yapısına ve üretilen peptitlerin moleküler ağırlığına bağlıdır (Sarmadi ve Ismail 2010). Örneğin, bitter tat oluşumundan sorumlu peptitlerin genellikle 1000 Da'dan daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğu, daha yüksek moleküler kütleye sahip fraksiyonlarda bu ihtimalin zayıfladığı bildirilmiştir (Li vd. 2022). Bu nedenle, gıdalara ilave etmek üzere biyoaktif ve fonksiyonel özellikte peptit üretiminin kontrollü hidroliz koşullarında gerçekleştirilmesi olası riskleri azaltmak bakımından önemlidir. Hidroliz işleminin yetersiz olması ile hedeflenen peptitlerin üretimi sekteye uğrayacağı gibi, ileri derece gerçekleşen hidroliz neticesinde de biyoaktif özellikli peptitlerin parçalanması muhtemeldir (Sun vd. 2021).



Şekil 2.2 Protein hidrolizi sonucu peptitlerin özellikleri (Tavano 2013)

Biyokimyasal hidroliz yöntemleri, antioksidan peptit üretimi için en yaygın olarak tercih edilen yöntemler olmalarına rağmen, bu yöntemler hala endüstriyel düzeyde yüksek

verim ve düşük maliyetle biyoaktif peptit üretimini gerçekleştirmek için uygun değildir. Bu nedenle, biyokimyasal hidroliz yöntemleri, yüksek hidrostatik basınç (HHP), mikrodalga ve darbeli elektrik alan gibi yeni gelişen işleme teknolojileri ile birleştirilerek, geleneksel yöntemlerle ilişkilendirilen sorunların üstesinden gelmek amacıyla son yıllarda çalışmalar yapılmaktadır (Yang vd. 2017, Dong vd. 2019, Gohi vd. 2019, Wen vd. 2020).

2.4.2 Mikrobiyal fermentasyon

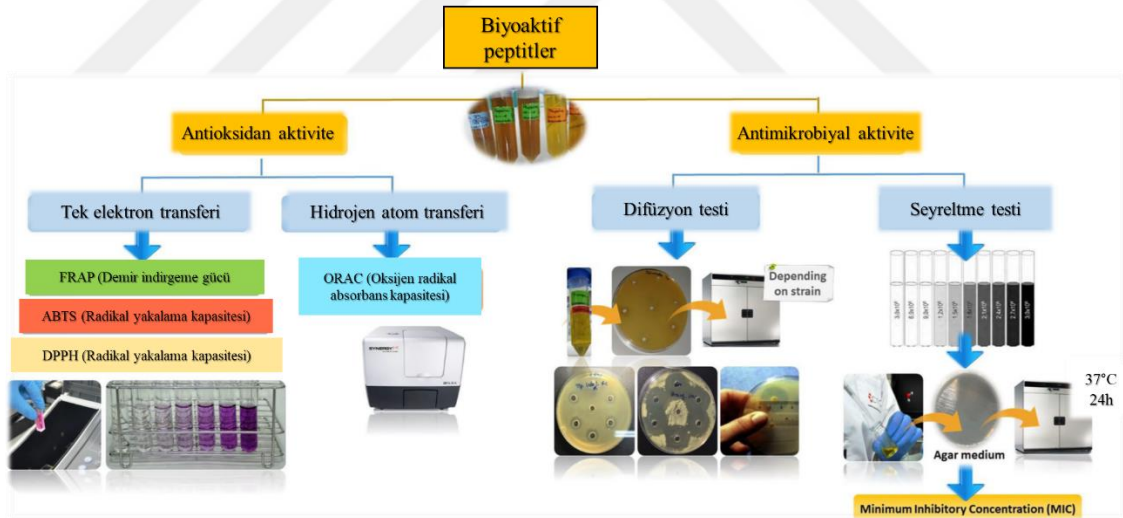
Fermente et ürünleri geleneksel olarak, doğal floranın spontan olarak çoğalması ya da starter kültür olarak belirli mikroorganizmaların kullanımı ile üretilir (Leroy vd. 2013). Fermentasyonun daha erken dönemlerinde, kas proteazları, sarkoplazmik ve miyofibriler proteinlerin büyük polipeptitlere parçalanmasından sorumludur. Ardından bu polipeptitler mikroorganizmalar tarafından salınan ekzopeptidazlar tarafından daha küçük peptitlere ve serbest amino asitlere parçalanırlar (Casaburi vd. 2008). Olgunlaşma sırasında gerçekleşen lipolitik ve proteolitik reaksiyonlar, düşük molekül ağırlıklı bileşikler (serbest amino asitler, peptitler, aldehitler, ketonlar, organik asitler vb.) üretir ve bu bileşikler nihai ürünün tipik aromasından sorumludur. Bu bileşikler arasında, laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesine bağlı olarak salınan peptitler, çeşitli fonksiyonel ve biyoaktif özellikler sergiler (Fadda vd. 2010).

Lactobacillus cinsine ait bazı türler, hücre zarı proteinazları aracılığıyla proteinleri 4-30 amino asit içeren peptitlere ayırabilirken, diğerleri peptidaz aktivitesine sahiptir (Raveschot vd. 2018). Koagülaz negatif *Staphylococcus* türleri, fermente sosislerde yüksek proteolitik ve lipolitik aktiviteleri nedeniyle tercih edilir. Bu bakteriler, tekstür ve aroma gelişimine katkıda bulunur (Khusro ve Aarti 2022). Bu nedenle, sosislerde kullanılacak starter kültürünün seçimi, nihai ürünün kalitesini etkilediği için son derece önemlidir. Örneğin, *Lactobacillus sakei* ve *Staphylococcus carnosus*, yüksek asit üretim kapasitesi, proteolitik ve lipolitik aktivite, amin-negatif karakter ve nitrat redüktaz aktiviteleri nedeniyle fermente et ürünlerinin starter kültür karışımlarına tercihen dahil edilir. Ayrıca *L. sakei*'nin nitrit tüketme yeteneği vardır. Bu iki bakteri birbirlerinin büyümesini uyarır ve biyojenik amin oluşumunun kontrolünde sinerjistik etkiye sahiptir.

Bu bakteriler fermente et ürünlerinde sağlığa zararlı bileşiklerin oluşumunu sınırlamada önemli rol oynarlar (Alfaia vd. 2018, Ashaolu vd. 2021, Wang vd. 2021).

2.5 Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerin İncelenmesi

Gıda proteinlerinden izole edilen antioksidan ve antimikrobiyal peptitler ve bu peptitleri içeren protein hidrolizatları, gıdalara fonksiyonel özellik kazandırmak ve/veya raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, yüzey aktif özelliklerinden dolayı çeşitli protein kaynaklarından elde edilen peptitler, hidrolizatlar ve proteinler, gıda emülsiyonlarında yağ-su ara yüzeyinde yer alabilirler. Antioksidan özellikleri ile oksidatif reaksiyonları geciktirme etkilerine ilaveten fonksiyonel özellikleri ile ürünün fiziksel özelliklerine katkıda bulunurlar. Şekil 2.3'te peptit ve hidrolizatların antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemede yaygın olarak kullanılan yöntemler gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Et yan ürünlerinden ekstrakte edilen peptitlerin aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan antioksidan ve antimikrobiyal analiz yöntemleri (Borrajo vd. 2020)

2.5.1 Antioksidan aktivite

Antioksidanlar, insan sağığına faydalı moleküller olarak tanımlanır, çünkü vücudu zararlı reaktif oksijen türleri adı verilen moleküllerden koruyabilirler. Bu tür moleküller hücre zarlarına, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilirler. Bu da sırasıyla kardiyovasküler hastalık, diyabet, kanser ve Alzheimer gibi birçok hastalığın nedeni olabilir (Ryan vd. 2011). Gıdalardaki oksidasyon, kalite kayıplarının başlıca nedenlerinden biridir. Bu durum lipitleri, proteinleri ve karbonhidratları etkiler. Lipit oksidasyonu raf ömrünün kısılmasına ve ransit (acı) tat oluşumuna yol açar. Gıdalarda protein oksidasyonu, lipit oksidasyonundan önemli düzeyde etkilenir. Lipit oksidasyon ürünleri proteinlerle reaksiyona girerek onların oksidasyonuna neden olurlar (Li ve Yu 2015). Gıda katkı maddeleri arasında güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olmaları ile tanınmış tert-bütillhidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve propil galat (PG) gibi birçok sentetik kimyasal antioksidan katkı maddesi olarak kabul edilmiştir. Bu maddeler, gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla yaygın olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu sentetik maddelerin DNA ve insan vücudunda enzim sistemi üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bu nedenle kullanımları sıkı denetimler altında gerçekleştirilmelidir. Belirtilen olumsuz etkiler tüketicilerin sentetik koruyucular yerine doğal ürünlere yönelmesine neden olmuştur. Tüm gıda ürünlerinde olduğu gibi et ürünlerinde de doğal antioksidanların kullanımı giderek önem kazanmaktadır (Liu vd. 2016, Yang ve Xiong 2018).

Peptitlerin antioksidan özellikleri çok sayıda araştırmanın odak noktası olmuştur (Di Bernardini vd. 2011, Lorenzo vd. 2018). Bu peptitler, reaktif oksijen türleri ile hızlı reaksiyona girebildikleri için oksidatif reaksiyonları yavaşlatmada etkilidirler. Antioksidan peptitlerin antioksidan aktivitesi, amino asit kompozisyonu, peptitlerin amino asit dizilimi, peptit zincirinin moleküler ağırlığı, N- ve C-terminallerde yer alan amino asit rezidüleri ve hidrofilik/hidrofobik özellikler ile ilişkilidir. Tek bir amino asidin antioksidan aktivitesi, o amino asidi içeren peptidin antioksidan aktivitesinden çok daha düşüktür (Li ve Yu 2015). Genel olarak, düşük molekül ağırlıklı peptitler, degradasyona uğramadan önce bağlı oldukları proteinlerden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Çünkü aktif bölgelerinin (antioksidan etki gösteren bölgeleri) serbest radikallere

erişimi daha kolaydır. Bu da öncelikli olarak lipit peroksidasyonunu, sonrasında ise lipit oksidasyonunu inhibe etmelerine olanak tanır. Birçok çalışma, amino asit kompozisyonunun ve peptit dizisindeki konumunun, peptitlerin antioksidan aktivitesinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, aromatik, asidik, bazik ve hidrofobik amino asitler, antioksidan peptitlerin aktif bölgeleridir (Yang vd. 2021). Örneğin, *N*-terminalde valin veya lösin gibi hidrofobik amino asitlerin bulunduğu, prolin, histidin ve tirozin amino asitlerini de yapısında barındıran peptitler antioksidan özellik gösterirler. Dizilimde yer alan prolin, peptit molekülünün sekonder yapısını değiştirir. Böylelikle, peptit yapısında yer alan amino asit rezidülerinin antioksidan olarak etkileşime girebilme olasılığını artırır. Lösin, serin, tirozin, treonin ve prolin amino asitlerinin çeşitli motiflerinin, özellikle *N*- ve *C*-terminus bölgelerinde, üstün radikal yakalama aktivitelerine katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Zou vd. 2016). Bazı araştırmacılar *C*-terminalde yer alan amino asitlerin antioksidan aktiviteyi belirleyici role sahip olduğunu ileri sürerken (Farvin vd. 2010), başka araştırmacılar, tripeptit ve tetrapeptitlerin antioksidan kapasitelerinin etkinliği açısından, *N*-terminalde ve zincir ortasında yer alan amino asitlerin antioksidan etkinliği belirlemede daha kritik role sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Manzoor vd. 2022).

In vitro antioksidan aktivite belirleme yöntemleri genellikle etki mekanizmalarına göre iki kategoriye ayrılır: hidrojen atom transferi (HAT) veya elektron transferi (ET). Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi, en popüler HAT yöntemlerinden biridir. En yaygın kullanılan ET yöntemleri ise 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil testi (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzthiazoline-6-sülfonik asit (ABTS) ve demir indirgeyici antioksidan güç ölçümleridir. Bu analizler farklı parametreleri ölçer ve dolayısıyla antioksidan aktiviteyi birbirlerinden farklı şekillerde ifade eder. Bu nedenle sonuçlar arasında korelasyon tespit edilmesi güçtür. *In vitro* yöntemlere ilaveten, antioksidan aktivite lipit oksidasyonu ve peroksidasyonunda meydana gelen değişimler saptanarak da ölçülebilir (Lorenzo vd. 2018, Maestri vd. 2019).

Antioksidan özelliğe sahip peptitlerin üretiminde kaynak olarak genellikle erişim kolaylığı nedeniyle çiftlik hayvanlarından elde edilen etlerle çalışılmış, ayrıca tavuk, domuz eti ve sığır eti gibi ürünlerden biyoaktif peptitler elde edilmiştir. Çünkü sık

tüketilen bu ürünlerin piyasada satış hacmine sahip olması daha kolaydır. Ancak tüketici tercihlerinde meydana gelen değişimler dikkate alınarak geyik eti (Bah vd. 2015; Kim vd. 2016) veya manda eti (Liu vd. 2010b) gibi diğer ürünler de incelenmiştir. Hidrolizde kullanılan enzimler üç farklı kaynaktan elde edilir: hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklar (Toldrá vd. 2018). Yaygın olarak kullanılan peptidazlar papain (papaya meyvesinden gelen sistein proteaz), bromelain (ananas meyvesinden elde edilen sülfidril proteaz), termolisin (*Bacillus thermoproteolyticus*'tan elde edilen metal proteaz), alkalaz (*Bacillus licheniformis*'ten elde edilen serin proteinaz) (Mora vd. 2014), flavourzyme (*Aspergillus oryzae* mantarının proteaz karışımı) (Feng vd. 2014), pepsin ve tripsin (sırasıyla hayvanların midesi ve pankreası tarafından salgılanan enzimler) (Wen vd. 2015) şeklindedir.

Mezbaha yan ürün ve artıklarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda peptit kaynağı ve hidrolizde kullanılan enzim çeşidinin önemi vurgulanmıştır. Di Bernardini vd. (2011), sığır karaciğerinden elde edilen peptit fraksiyonlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada alkalaz, papain ve tripsin enzimleri ile hidroliz edilen domuz karaciğerinin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır (Verma vd. 2017). Tripsin ile hidroliz edilen örneklerin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Karaciğerin bilinen antioksidan aktivitesine ek olarak, Damgaard vd. (2014), apandis, kolon, kalp, karaciğer, akciğer, pankreas ve rektum gibi domuz yan ürünlerinden de antioksidan hidrolizatlar elde edilebileceğini göstermiştir. Tavuk iç organlarından elde edilen protein hidrolizatları da antioksidan aktivite göstermektedir (Jamdar vd. 2012). Kan, önemli protein içeriği nedeniyle biyoaktif peptit kaynağı olarak kabul edilen başka bir mezbaha yan ürünüdür (Bah vd. 2013). Yapısal olarak iki kısımdan oluşur (hemoglobin ve plazma) ve her iki kısım da potansiyel biyoaktif peptit kaynağı olarak bildirilmiştir. Özellikle büyükbaş hayvan kanından yüksek antioksidan aktiviteye sahip hidrolizatlar üretilmiştir.

Et ve et ürünlerinden mikrobiyal fermantasyon yoluyla çok sayıda antioksidan peptit izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Örneğin, Mora vd. (2015), İspanyol kuru fermente sosisinin, *Lb. pentosus* ve *Staphylococcus carnosus* ile iki aşamalı olgunlaştırma süreci (22 saat

boyunca 15 ila 20 °C ve 43 gün boyunca 9 °C) öncesinde fermentasyonu ile antioksidatif aktiviteye sahip peptitlerin meydana geldiğini rapor etmiştir. Gallego vd. (2018), *Lb. sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *S. xylosus* ve *S. carnosus* içeren bir starter kültür karışımı kullanarak İspanyol kuru fermente sosis, *Lb. sakei* ve *S. xylosus*'un karışımını kullanarak İtalyan kuru fermente sosis ve *Lb. sakei*, *S. carnosus* ve *S. xylosus* kültürlerini kullanarak Belçika kuru fermente sosis üretmiştir. Bu sosislerden elde edilen peptit ekstraktlarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Belçika kuru fermente sosis ekstraktları ise en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmuştur. Yu vd. (2021), *Lb. plantarum* CD101 ve *S. simulans* NJ201 ile domuz sarkoplazmik ve miyofibriler proteinleri 30 °C'de 4 gün boyunca fermente ederek antioksidan peptitler elde etmiştir. Bu iki starter kültürün hem sarkoplazmik hem de miyofibriler proteinleri hidrolize edebildiğini, ancak sadece sarkoplazmik proteinlerden hidrolize edilen peptitlerin antioksidan aktivitesinin önemli düzeyde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

2.5.2 Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal peptitler genellikle 50 veya daha az sayıda amino asitten meydana gelir. Bunların yaklaşık %50'si hidrofobik özelliktedir ve moleküler ağırlığı 10 kDa'nın altındadır. Bu peptitler, in vitro olarak enzimatik hidroliz yoluyla üretilebildiği gibi mikroorganizmalar tarafından fermentasyon yöntemiyle de üretilebilir. Birçok mikroorganizma antimikrobiyal peptitleri bir çeşit savunma mekanizması (bağışıklık sisteminin bir parçası) olarak üretirler (Shahidi ve Zhong 2008). Hidrolizatların veya peptitlerin antimikrobiyal aktivitesini test etmek için çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Agar difüzyon testi, protein hidrolizatlarının ve peptitlerin antimikrobiyal aktivitesini test etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, antibiyotiklerin bakteriyel büyümeyi engelleme yeteneğini ölçer. Agar difüzyon tekniği genellikle katı ortamlardaki minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) belirlemek için kullanılır (Najafian ve Babji 2014).

Bakteriyel ajanların inhibisyonunda önemli bir rol oynamaları sebebiyle antimikrobiyal peptitler, son yıllarda giderek önem kazanmıştır. Bu peptitler yapısal farklılık göstermelerine rağmen çoğunlukla katyonik ve amfipatik karakterleriyle ön plana

çıkarlar. Böylelikle, bakteri hücre zarına ait bileşenler ile etkileşime girerler (Bechinger 2009). Pozitif net yük ve hidrofobik amino asitlerce zengin olmaları belirgin özellikleridir. Antioksidan peptitlerde olduğu gibi amino asit kompozisyonu ve dizilimi antimikrobiyal aktiviteyi etkiler. Genellikle yapılarında lisin, arginin, triptofan gibi hidrofobik amino asitleri barındırırlar. Katyonik yapısı ve geometrisi nedeniyle arginin, kompleks özellikleriyle ise triptofan amino asitlerinin peptit sekansında yer alması antimikrobiyal etkiyi artırır. Bu amino asitler, peptitlerin hücre zarına bağlanma yeteneğini artırır; hidrojen bağları, negatif yüklü yüzeylerle etkileşimi destekler (León vd. 2020). Peptitlerin antimikrobiyal aktivitesini artırmaya yönelik yapılan çalışmalar genellikle net yükün artırılmasını hedeflemiştir. Liu vd. (2019) yaptığı bir çalışmada, peptit yapısında yer alan lisin amino asidini alanin ile değiştirmiş ve pozitif yükün artmasını sağlamıştır. Modifikasyon sonucu antimikrobiyal aktivitede meydana gelen artış peptitlerin katyonik yükünün membran üzerindeki etkisini artıran önemli bir faktör olduğunu vurgulamıştır.

Antimikrobiyal peptitler, yüksek seçicilik, düşük toksisite ve termal stabilite gibi bazı özellikleri nedenleriyle gıda endüstrisinin ilgisini çekmiş, gıda kaynaklı patojenleri ve bozulma yapan mikroorganizmaları inhibe etme yetenekleri sayesinde gıda muhafazasında önemli yere sahip olmuşlardır (Ebbensgaard vd. 2015). Prokaryotik kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal peptitler, bakteriyosinler olarak bilinmektedir ve uzun yıllardan beri gıdalara koruyucu olarak ilave edilmektedir. Birçoğu düşük molekül ağırlıklı katyonik peptitlerdir ve hedef hücre zarlarında gözenekler oluşturarak yapısını bozmakta, nihayetinde hücre ölümüne yol açmaktadır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermelerinin yanı sıra, antibakteriyel ve antifungal aktiviteye de sahiptirler (Baindara vd. 2018). Peptit zincirinde yer alan amino asitlere bağlı olarak antimikrobiyal seçicilik ve spesifite değişkenlik gösterir. Örneğin glisin amino asitleri bakımından zengin peptitler Gram-negatif bakteriler üzerine etkilidir (Chou vd. 2019). Bu seçiciliğe dair bir başka çalışmada ise *Streptomyces albulus*'un rekombinant bir suşu tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı (1.3–2.3 kDa) ϵ -Poly-L-lisin'in antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bu peptidin bakterilere karşı inhibe edici etkisi azalmış olmasına rağmen, mayalara karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Xu vd. 2019). Gıdalarda kullanılan antimikrobiyal peptitler arasında en yaygın olanı nisin!dir. 50'den

fazla ülkede güvenli ve doğal bir gıda koruyucusu olarak işlenmiş peynir, pastörize süt ürünleri ve konserve sebzelerde kullanılmaktadır. ϵ -polylisin ise *Streptomyces albulus* tarafından üretilen bir katyonik antimikrobiyal peptittir ve 25-35 L-lisin molekülünden oluşur. Bu peptit, geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahiptir. Gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile maya, küf ve virüslere karşı öldürücü etkisi vardır. *E. coli* ve *Salmonellae* gibi diğer doğal antimikrobiyallerin zor etki ettiği patojenlere karşı iyi bir antibakteriyel etki gösterir. Genellikle Japonya ve Kore'de gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilmiştir.

Birçok araştırmacı, et proteinlerinden antibakteriyel özelliklere sahip fonksiyonel biyolojik moleküllerin verimli bir şekilde üretilmesi için fermentasyonu etkili bir yöntem olarak göstermiştir. Pleurocidin, laktoferrin, defensinler ve protamin gibi hayvansal kökenli potansiyel antimikrobiyal etkileri bulunan çok sayıda peptit belgelenmiştir. Hayvan dokularından, domuz, sığır, kümes hayvanları, balık ve deniz canlıları gibi farklı kaynaklardan çeşitli peptitler izole edilmiştir. Bu peptitlerin, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Yersinia enterocolitica* gibi bakterilere karşı antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu doğrulanmıştır (Kęska vd. 2018). Enzimatik hidroliz yöntemiyle sığır hemoglobininin (Daoud vd. 2005), domuz, koyun ve geyik kan plazmasından (Bah vd. 2015), domuz (Verma vd. 2017) ve tavuk (Chakka vd. 2015) karaciğerinden üretilen peptitlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, hayvansal kaynaklı antimikrobiyal peptitler insan sağlığına fayda sağlamak ve/veya gıdanın stabilitesini artırmak amacıyla fonksiyonel bileşenler olarak uygulanabilir.

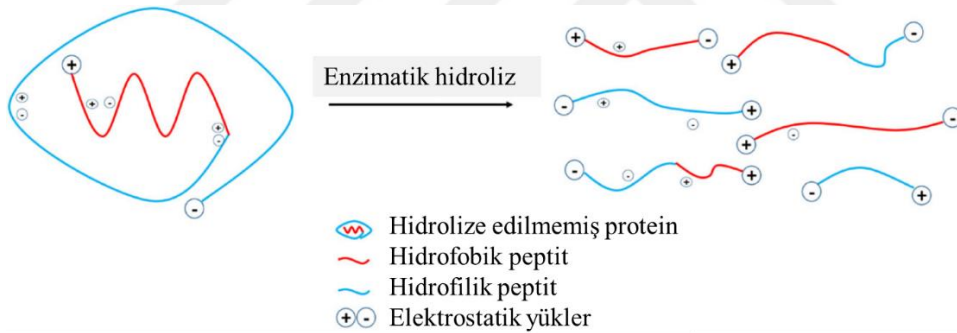
2.6 Fonksiyonel Nitelikler ve Gıda Kalitesini Artırma Potansiyeli

Tüm proteinlerin fonksiyonel özellikleri arasında, çözünürlük muhtemelen gıda sistemlerindeki genel kullanışlılıklarını en fazla etkileyen özelliktir. Köpürme ve emülsiyon oluşturma gibi diğer dokuyu belirleyen fonksiyonel özellikler genellikle proteinin ilgili ortamda çözünür olmasını gerektirir. Bu nedenle, bu açıdan bakıldığında, çözünmeyen proteinlerin gıdalarda çok sınırlı uygulama potansiyeli vardır. Bir proteinin

çözünürlüğü, protein-protein etkileşimlerini destekleyen ve çözünürlüğü azaltan hidrofobik etkileşimler ile protein-su etkileşimlerini teşvik eden iyonik etkileşimler arasındaki denge sonucunda oluşur. Bu denge, proteinin içsel yapısal özellikleri tarafından doğrudan etkilenir. Birincil protein yapısını oluşturan amino asitlerin hidrofobik özelliği ve yükü, çözünürlük üzerinde büyük bir etkiye sahiptir, ancak proteinin konformasyonu ve yüzey özellikleri de bir o kadar önemlidir. Ayrıca, genellikle daha büyük proteinler, daha küçük olanlara göre daha düşük çözünürlüğe sahiptir, çünkü çökme durumunda entropi azalması daha azdır (Wouters vd. 2016). Proteinlerin peptitlere ve daha küçük yapılara parçalanması, çözünürlüğü yüksek ürünler oluşturur. Aynı zamanda ileri seviyede hidrolizlerden elde edilen hidrolizatların daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Peptit yapısında meydana gelen hidrofilik ve hidrofobik kuvvetlerin dengesi, çözünürlük artışı üzerindeki bir başka önemli faktördür. Protein hidrolizatlarının kutupsal ve iyonlaşabilir gruplarına ek olarak enzimatik hidroliz, moleküler boyutu ve hidrofobik özelliği etkiler ve bu faktörler peptitlerin yapısını değiştirerek çözünürlüğün değişmesine neden olur. Çözünürlük değişimleri, peptitlerin net yüküne ve yüzey hidrofobisitesine bağlıdır. pH izoelektrik noktasından uzaklaştıkça çözünürlük artar ve yüzey hidrofobisitesi hidrofobik etkileşim yoluyla agregasyonu teşvik eder (Karami ve Akbari-adergani 2019).

Emülsiyon sisteminin oluşturulma mekanizması, hidrojenizasyon sırasında taze olarak oluşan yağ damlacıklarının yüzeyine peptitlerin adsorpsiyonuna ve yağ damlacığının birleşmesini engelleyen koruyucu bir membranın oluşumuna bağlanır (Yang ve Xiong 2018). Çeşitli faktörler, emülsiyon stabilitesine katkıda bulunur. Bunlar arasında sıcaklık ve pH, depolama süresi, iyonik kuvvet ve işleme teknolojisi gibi etkenler yer alır, burada sıcaklık ve süre iki temel belirleyicidir (Tamang vd. 2022). Peptitlerin çözünürlük ve antioksidan özellikleri emülsiyon stabilitesini doğrudan etkiler. Köpük stabilitesi ise genellikle yüksek moleküler ağırlığa sahip peptitlerin varlığı ile ilişkilidir. Yapısal olarak açılmış proteinlerin hidrofobisitesi, köpürme özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek seviyede gerçekleşen hidroliz, küçük peptitlerin oluşumuna neden olur ve köpük stabilitesini azaltabilir (Klompong vd. 2007).

Su tutma, temel kalite özelliklerini ve protein ürünlerinin verimini etkileyen önemli bir faktördür çünkü gıdaların mekanik dayanıklılığı, elastikiyeti, plastisitesi ve akışkanlığını belirlemede önemli bir rol oynar. Aynı zamanda proteinlerin şişme, ıslanabilirlik, su tutma kapasitesi, jel oluşumu ve yüzey özellikleri gibi arzu edilen fonksiyonları için kritik bir öneme sahiptir (Ge vd. 2000). Et ürünlerinin su tutma kapasitesi, ürün verimini etkileyen önemli bir kalite özelliğidir. Ekonomik sonuçları da olabilen su tutma kapasitesi, aynı zamanda ürün tekstürünü etkilemesi nedeniyle önemlidir (Cheng ve Sun 2008). Birçok çalışma protein hidrolizinin su tutma kapasitesi üzerinde olumlu bir etki yaratabileceğini göstermiştir. Polar iyonlaşabilir grupların daha fazla erişilebilir olması su tutma kapasitesini artırmaktadır. Ancak, hidroliz sonucu ortalama MA'nın azalması, proteinin fiziksel olarak suyu hapsetme yeteneğini zayıflatır. Ayrıca, hidrofobik grupların daha yüksek düzeyde kullanılabilir olması su tutma kapasitesini olumsuz etkileyebilir (Şekil 2.4). Bu etkiler arasındaki denge, protein hidrolizatının su tutma kabiliyetini belirler (Wouters vd. 2016).



Şekil 2.4 Enzimatik protein hidrolizinin şematik gösterimi (Wouters vd. 2016)

Bir protein jeli oluşturmak için (globüler) proteinin doğal yapısı, farklı protein ipliklerinin etkileşimi ve agregasyonunu kolaylaştırmak için açılmalıdır (protein denatürasyonu yoluyla). Jel oluşumu, ısı veya basınç gibi fiziksel bir uyarıcı veya asit veya enzim gibi kimyasal bir uyarıcı tarafından başlatılabilir. Dolayısıyla protein hidrolizi sonucu meydana gelen peptitler jel oluşturma kabiliyetine sahiptir. Farklı moleküler kuvvetler, bir protein ağı oluşturulmasına katkıda bulunur. Bu moleküler kuvvetler arasında kovalent bağlar (çoğunlukla disülfid bağları), hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları yer alır (Sun ve Arntfield 2012). Bu tür bağların meydana gelme derecesi, proteinin amino asit kompozisyonu, hidrofobisite, MA'na ve disülfid bağları oluşturma yeteneği gibi iç

faktörlere, aynı zamanda protein konsantrasyonu, pH, sıcaklık, basınç ve iyon gücü gibi gıda matrisinin özelliklerini kapsayan dış faktörlere bağlıdır (Foegeding ve Davis 2011).

Yağ bağlama kapasitesinin mekanizması, yağın bir protein ağı içinde fiziksel olarak hapsolmasıyla ilişkilendirilir. Bazı çalışmalar, hidroliz derecesinin yağ bağlama kapasitesi üzerinde etkisi olmadığını göstermiştir. Bu ifadeler, hidroliz yoluyla proteinlerin degradasyonu ve peptit oluşumunun hidrolizatların esnekliğini artırabileceği şeklinde açıklanabilir. İleri düzeyde gerçekleşen hidroliz işlemi, birçok peptit bağının kırılmasına neden olacağından yağ bağlama kapasitesinin azalmasına neden olur (Souissi vd. 2007, Balti vd. 2010). Su tutma kapasitesi ile peptitlerin hidrofilik özellikleri arasındaki ilişki, yağ bağlama kapasitesi ile hidrofobik özellikler arasında söz konusudur. Protein hidrolizatlarının çözünür fraksiyonundan ziyade çözünmez fraksiyonunun yağ bağlama kapasitesi daha yüksektir (Hajfathalian vd. 2018).

Lipit oksidasyonu, et ve et ürünlerinin bozulmasında başlıca bir endişe kaynağı olarak tanımlanmıştır. Ürünün besin değeri, tekstürel özellikleri ve lezzeti lipit oksidasyonundan etkilenir. Oksidasyon sürecinin son ürünleri, et ve benzeri ürünlerin rengini, aromasını bozar ve ileri düzeyde oksidasyon ransit tat oluşumuna neden olur (Sohaib vd. 2017). Hayvansal yağların oksidasyona yüksek derecede duyarlı olmasının nedeni çeşitli faktörlerle ilişkilendirilebilir. Bunlar, membran fosfolipitlerinin bileşenleri olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin nispeten yüksek oranı, bitkisel ve diğer bitkisel yağlarla karşılaştırıldığında tokoferoller gibi endojen antioksidanların eksikliği, yüksek konsantrasyonlarda tuz ilavesi (NaCl) ve genellikle üretim prosesi sırasında ortama dahil edilen moleküler oksijenin fazla olmasıdır (Jiang ve Xiong 2016). Biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri dolayısıyla peptitlerin et ve et ürünlerine ilavesi ürün güvenliği sağlamanın yanı sıra ürünün kalite özelliklerini olumlu etkilemesi bakımından önemlidir.

Su içinde yağ emülsiyonları, fonksiyonel gıda ürünlerinin büyük bir kısmını oluşturur. Emülsiyonlarda meydana gelen lipit oksidasyonu, flokülasyona ve faz ayırımına neden olan, fiziksel stabiliteyi etkileyen önemli sorunlardan biridir. Hem hayvan hem de bitkilerden elde edilmiş protein hidrolizatları son yıllarda emülsiyonların stabilitesini sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Wouters vd.2016). Hayvansal yan

ürünlerden elde edilen hidrolizatların daha önce belirtildiği üzere çeşitli avantajlara sahip olması nedeniyle emülsiyonlarda tercih edilmesi, biyolojik olarak aktif bileşiklerin iletilmesinin bir yolu olabilir. Ancak bu bileşiklerin gastrointestinal sistemden geçerken nasıl bir yapısal ve fonksiyonel değişime uğrayacağı hala bilinmemektedir. Hidrolizatların emülsiyonlarda kullanılmasının bir diğer nedeni olarak yüksek antioksidatif özelliklerinden dolayı lipit oksidasyonunu sınırlayarak emülsiyonun stabilitesini sağlama ve ara yüzey gerilimini düşürerek kinetik olarak emülsiyonu stabilize etme potansiyeli gösterilebilir (Mwangi vd. 2020). Bu kapsamda, hayvan ve bitki kaynaklı proteinlerin emülsifikasyon özellikleri iyi bilinmektedir. Ancak ürüne antioksidan özellik kazandırmak amaçlanıyorsa proteinin peptitlere parçalanması önemlidir. Orta dereceli bir protein hidrolizinin gerçekleştirilmesi, çözünürlüğü ve yüzey hidrofobisitesini artırmak amacıyla tercih edilebilir. Böylelikle, oluşan peptitler yağ-su arayüzeyine daha fazla tutunabilirler. Öte yandan, 2 kDa'dan daha küçük peptitlerin oluştuğu ileri dereceli hidroliz işlemi, proteinlerin fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkileyebilir (Schröder vd. 2017).

2.7 Peptitlerin Gıda Üretim Proseslerine Karşı Stabilitesi

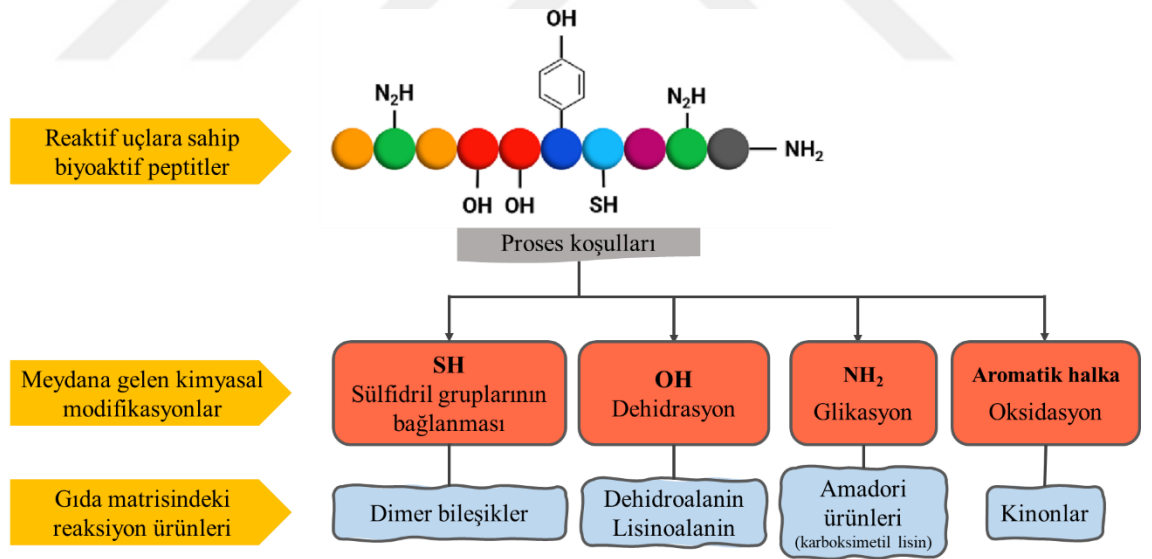
Gıda işleme yöntemleri biyoaktif peptitlerin biyolojik aktivitesini önemli ölçüde etkileyebilir. Ultrason, ısı ve radyasyon gibi fiziksel yöntemler, protein yapısını ve fonksiyonelliğini değiştirme potansiyeline sahiptir. Ayrıca maillard reaksiyonlarına yol açan bu tür uygulamalar alerjen bileşiklerin oluşumuna neden olabilir. Gıdalara uygulanan işlemler, peptitlerin gastrointestinal sindirim, emilim ve bağışıklık sistemi tepkisine karşı duyarlılığı gibi özelliklerini etkileyebilir. Bu nedenle, peptitlerin biyoaktivitelerini korumak veya artırmak amacıyla en uygun proses koşullarının belirlenmesi önemlidir. Ancak, bir peptidin aktivitesini azaltabilecek işleme yönteminin diğerlerinin aktivitelerini artırabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, bazı peptitler ise ısıl işlem后会 sonra aktivitelerini kaybederken α -laktalbuminin ve lizozimin antibakteriyel aktivitesi ısıyla denatüre olduktan sonra artar (Daliri vd. 2017).

Mikroorganizmaları öldürmek ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için termal ve termal olmayan işleme teknolojileri yaygın olarak kullanılır. Biyoaktif peptitlerin diğer

gıda bileşenleri ile kimyasal reaksiyonlara girme kabiliyeti, uygulanan işlemin etkisiyle artabilir ve biyoaktif özelliklerin değişmesine neden olabilir. Çeşitli gıda proseslerinin peptitlerin biyoaktif özellikleri üzerindeki etkisi genellikle iki şekilde araştırılır. Birincisi, enzimatik hidroliz öncesinde işleme teknolojisinin gıda proteinlerine uygulanmasıdır ve amaç, biyoaktif peptit salınımını artırmaktır. Örneğin, süt protein konsantresinin ısıtılması, mikrodalga ve ultrases ön işlemlerine maruz bırakılması sonucu hidrolizatlarının antioksidan kapasitesini önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, mercimek proteinlerinin yüksek basınca maruz bırakılması, oluşan peptitlerin anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör ve antioksidan özelliklerini artırmıştır. İkinci yaklaşım, biyoaktif peptitlerin doğrudan gıda işleme teknolojisi ile üretilmesi ile peptit yapısındaki ve biyoaktif özelliklerindeki değişiklikleri belirlemektir. Son zamanlarda, soya fasulyesi protein türevi pentapeptit SHCMN'nin antioksidan kapasitesini artırmak için darbe elektrik alanı kullanılmıştır ve bunun peptidin ζ -potansiyelinde (artan negatif yük) ve sekonder yapılarında (α -spiral ile rastgele sargı ve β -katlanma) uygulanan işleme bağlı olarak değişim meydana geldiği bildirilmiştir. Öte yandan, jambondan elde edilen peptitlerin ısı işleme maruz bırakılması sonucu ACE inhibitör aktivitesinin değiştirmedeği ve peptitlerin termal stabilite gösterdiği rapor edilmiştir. Günümüzde gıda işleme yöntemlerinin peptitlerin yapı ve biyoaktiviteleri üzerindeki etkilerini yeterli düzeyde açıklayacak bilgi literatürde yer almamaktadır (Maestri vd. 2019).

Birçok peptit, nükleofilik amino, karboksil, imino ve sülfidril grupları aracılığı ile kimyasal reaksiyonlara kolaylıkla girebilir. Bu reaksiyonlar intramoleküler veya intermoleküler olarak gerçekleşmektedir. Şekil 2.5'te özetlendiği üzere, çeşitli reaksiyonlar sonucu peptitlerde yan zincir modifikasyonları meydana gelir. Bu modifikasyonlar, peptitlerin doğal yapılarında değişikliklere ve sonuç olarak yeni bileşiklerin oluşumuna neden olur. Ayrıca, glikasyon ve sistein disülfür oluşumu sonucunda peptit kondensasyonu ve çapraz bağlar oluşabilir. İndirgen şekerlerle peptitlerin *N*-glikasyonu, uygun koşullarda amadori ürünlerinin ve daha sonra maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumuna yol açar (Van Lancker vd. 2011). Bu reaksiyonların, biyoaktif peptit üretmek için yararlanılan enzimatik hidroliz işlemi sırasında da gerçekleştiği bilinmektedir (Mohan vd. 2015). Peptitlerin molekül yapıları bu

reaksiyonların oluşumunu etkilemektedir. Örneğin, yapıda lizin amino asidine bağlı şekilde bulunan hidrofobik amino asit rezidülerinin varlığının dipeptit glikasyonunu teşvik ettiği belirlenmiştir (Mennella vd. 2006). Glikasyon ve maillard reaksiyonunun başlatıldıktan sonra spontan olarak devam ettiği ve kontrol edilemez olduğu, peptitlerin yapısal çeşitliliği göz önüne alındığında ise protein hidrolizatlarında yer alan peptitlerin bir şeker molekülü ile reaksiyona girmesi durumunda yüzlerce peptit olmayan bileşik oluşabileceği belirtilmektedir. Yüksek su aktivitesi, sıcaklık ve basınç koşullarında amino asit rezidülerinin intramoleküler siklizasyonu meydana gelebilir. Lipit oksidasyonunun reaktif karbonil ürünleri de peptit yan zincir (imidazol, guanidin, sülfidril, e-amin) grupları ile yeni ürünler oluşturmak üzere kolaylıkla reaksiyona girebilir ve gıdaya ilave edilen katkı maddeleri peptitlerle reaksiyona girerek yapısal değişimlere neden olabilir (Udenigwe ve Fogliano 2017). Ayrıca, çeşitli gıda işleme koşullarının etkisiyle protein ve peptit yapısındaki amino asit rezidülerinin kimyasal modifikasyonları her zaman polimer oluşumu ile sonuçlanır. Bu tür polimerizasyonlar peptitlerin biyoaktif özelliklerini olumsuz etkiler (Lambrecht vd. 2017).



Şekil 2.5 Gıdalara uygulanan proseslerin matris içindeki peptitlerde meydana getirdiği yan zincir modifikasyonları (Udenigwe ve Fogliano 2017)

Yukarıda izah edildiği üzere, gıdalara biyoaktif peptitler ilave edilirken üretimde yararlanılan prosesler ve proses koşulları dikkate alınmalıdır. Peptit modifikasyonuna neden olan ve biyoaktif özelliğe zarar veren, ayrıca zararlı (alerjen, toksik vb.) bileşiklerin

oluşumu ile sonuçlanması muhtemel yöntemlerden kaçınılması, bu tarz ürünlere peptit ilavesi yapılmaması veya peptitlerin stabilizasyonunun önceden sağlanması gerekmektedir.

2.8 Potansiyel Riskler ve Güvenlik Değerlendirmesi

Duyusal nitelikler ve ürün güvenliği, biyoaktif peptit içeren gıda ürünlerinin üretiminde dikkate alınması gereken iki temel parametredir. Peptit ilave edilen gıdalarda, matriksin bileşenleri olan polisakkaritler, yağlar ve lektinler, biyoaktif peptitler ile reaksiyonlara girebilmekte veya yapıya bağlanabilmektedir. Sonuç olarak yapısı değişen peptitler gıdanın tat, tekstür ve çeşitli kalite özelliklerini etkiler. Çok sayıda çalışma, yüksek lifli gıda matrikslerinin biyoaktif peptitlerin bu lifsi yapılara hapsedilebilir olması nedeniyle tercih edilebileceğini bildirmiştir. Hidrofobik peptitler ile ilişkilendirilen bitter tadı zayıflatmak veya maskelemek amacıyla bu tarz ürünlerin daha iyi duyuşal özellikler sağlayabileceği gösterilmiştir. Bu şekilde formüle edilen peptit ilaveli fonksiyonel gıdaların daha iyi duyuşal özelliklere sahip olacağı ve tüketici tarafından kabul edilebilirliğinin artacağı düşünülmektedir (Sun vd. 2020).

Peptitlerin gıdalara ilave edilmeden önce gıdada meydana getirebileceği olumsuz etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir. Gıdalardan elde edilen biyoaktif peptitlerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini değerlendiren sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Sitotoksik etkileri ile ilgili bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen bu etkilerin kötü huylu hücreler üzerine olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle peptitler, potansiyel anti-kanser ajanları olarak kabul edilebilirler. Gıdalardan ve polenlerden gelen alerjen maddelerin çoğu protein yapısında bileşiklerdir. Biyoaktif peptitler ise proteinlerin hidroliz ürünleridir ve proteinlerin düşük moleköl ağırlıklı peptitlere parçalanması sırasında alerjen özellikleri zayıflar. Ancak, bazı peptitlerin hidroliz öncesinde yapısında bulunduğu proteinin alerjen özelliklerinin bir kısmını taşıyabileceği için alerjen etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Sarmadi ve Ismail 2010). Ayrıca, gıda kaynaklı biyoaktif peptitlere yönelik endişeler arasında bağırsak duvarı bozulması, eritrosit ve lenfosit toksisitesi, serbest radikal üretimi, enzimopatik ve immünopatik doku hasarı ve peptitlerin tüketimine bağlı sitotoksikite, biyolojik sistemlerde çeşitli karmaşık

bozukluklara yol açan temel sorunlar yer almaktadır (Khan vd. 2018). Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalar, gıdalardan enzimatik hidroliz veya mikrobiyal fermentasyon yöntemleri ile üretilen bu peptitlerin hücre kültürleri üzerinde herhangi bir toksisite göstermediğini ortaya koymuştur. Söz konusu riskler, üretilen peptitlerin üretim proseslerinin etkisiyle veya depolama sırasında çeşitli modifikasyonlara uğraması durumunda geçerlidir. Bu nedenle, biyoaktif peptitler genellikle güvenli olarak kabul edilir, ancak peptitlerin kalitesini ve güvenliğini bozabilecek işleme yöntemlerinden kaçınılmalı, peptit stabilitesi korunmalıdır.

Çok sayıda biyoaktif peptidin bitter özelliğe sahip olması, bunların fonksiyonel gıdalarda, takviyelerde ve oral alım amaçlı ilaçlarda yaygın olarak kullanılmasının önündeki en büyük engellerden biridir. İnsanlar, beş temel tat arasında ayırım yapabilirler: tatlı, ekşi, tuzlu, umami ve acı. Her tadın, farklı reseptör alt kümeslerinde ifade edilen farklı transdüksiyon yolları tarafından iletildiği düşünülmektedir. Bitter tat, G-proteinleri ilişkili reseptör (Tip-2 Receptor [T2R]) ailesi tarafından iletilmektedir (Lafarga ve Hayes 2017). Peptitlerin amino asit diziliminin bitter tada sahip peptit oluşumunu önemli düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Mirzapour-Kouhdasht vd. 2023). Hidrofobik karaktere sahip amino asitlerin varlığı bitter tat açısından en kritik faktörlerden biridir (Maehashi ve Huang 2009). Ancak, peptit yapısındaki yan zincirler, amino asitlerin dağılımı ve konumu, hidroliz derecesi, amino asit yapısı, peptit dizilimi ve amino asit yan zincirinin karbon sayısı gibi faktörler bitter tat özelliklerini etkileyebilir. Bitter özellik gösteren çok sayıda peptit, süt proteini, soya proteini, buğday gluten proteini ve inek hemoglobini gibi çeşitli protein kaynaklarından elde edilen hidrolizatlarda yaygın olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, proteinlerin hidroliz derecesinin %8'in üzerine çıkmasıyla, sütte bitter peptitlerin oluşumunun arttığını bildirmişlerdir. Protein hidrolizini gerçekleştiren enzim türü, üretilen acı peptit türlerini ve miktarlarını etkiler. Örneğin, peynir altı suyu proteinlerini alkalaz 2.4 L ile hidrolizinin, aynı reaksiyon koşullarında prolyve veya corolase enzimleri ile hidrolizi ile kıyaslandığında daha fazla bitter peptit oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Spellman vd. 2009). Sığır karaciğerinden üretilen peptitlerin bitter özellik gösterdiğine dair bir çalışma henüz yoktur. Ancak, Bhat vd. (2015) et, balık ve jelatinden elde edilen protein hidrolizatlarının diğer protein kaynaklarına kıyasla daha az bitter peptit içerdiğini bildirmiştir.

Biyolojik olarak aktif peptitlerin bitter özelliğini zayıflatmak amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmiştir, ancak bunların etkinlik düzeyleri ve ticari uygulama potansiyelleri farklılık gösterir. Bitter tadının zayıflatılması için iki temel yaklaşım debittering (acı tadı giderme) ve taste masking (tat gizleme) kabul görmektedir. Protein hidrolizatlarının ve peptitlerin bitter özelliğini azaltmak için pratik uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır ve bu uygulamaların peptitlerin biyolojik aktivitelerini olumsuz etkilememesi önemlidir. Aktif karbon gibi bazı uygulamaların bitter tadı azaltmada etkili olduğu ancak hidrolizatlarda hedeflenen biyoaktif özelliklerin ve bazı bileşenlerin kaybına yol açmıştır. Enkapsülasyon teknikleri, bu amaçla geliştirilen en umut verici yöntemlerden biridir. Bitter peptitlerin çeşitli kolloidal partiküller içinde hapsedilmesi suda çözünürlüklerini, stabiliteilerini ve biyolojik aktivitelerini artırabilir. Aynı zamanda peptitlerin ağızda bitter tat reseptörleri ile etkileşmelerini önleyerek gıdanın duyuusal özelliklerini korur (Mirzapour-Kouhdasht vd. 2023).

Son olarak, peptitlerin fonksiyonel gıda üretiminde uygulama alanı bulabilmesi için ağızdan hedef organlara ulaşmaya kadar yapı ve biyolojik aktivitelerini muhafaza etmeleri, yani stabil kalabilmeleri, gerekmektedir (Udenigwe vd. 2021). Farklı peptitlerin biyoaktivitesi, in vitro deneylerde in vivo uygulamalardan farklı olabilir. Çünkü peptitlerin biyoyararlılığı ve emilim özellikleri, sindirim sisteminde yer alan fizyolojik enzimlerin etkisiyle meydana gelen yapısal değişimler neticesinde azalabilir. Bu nedenle biyoaktif peptitlerin, sindirim sisteminde yer alan enzimlere karşı direnç göstermeleri ve kan serumu tarafından kolayca emilerek herhangi bir yapısal değişime uğramaksızın hedef dokuya taşınmaları gereklidir (Bhandari vd. 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada peptit kaynağı olarak aynı ırk (Holstein, erkek) ve yaşta (1.5) yeni kesilmiş üç adet sığırın karaciğeri kullanılmıştır. Emülsiyonların hazırlanmasında piyasadan temin edilen kanola yağı kullanılmıştır. Soya fasulyesinden elde edilen %35 hidrolize L- α -fosfatidilkolin lipozom hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sucuk üretiminde, aynı sürüde yetişen üç adet 1.5 yaşında Holstein erkek sığırların boyun ve döş bölgesinden elde edilen etler ve hayvansal yağ (1:1 oranında sığır iç yağı: kuyruk yağı) kullanılmıştır. Etler kesimden sonra en az 24 saat dinlendirilmiş karkastan elde edilmiştir. Dinlendirilmiş soğuk et ve donuk haldeki hayvansal yağ 3 mm aynadan kıyma çekilmiş ve -18°C’de dondurulmuştur. Et ve yağ kullanılacağı zaman 4°C’de 16 saat çözündürülmüştür. Sucuk üretiminde kullanılan baharat (karabiber, acı ve tatlı kırmızıbiber, kimyon), sarımsak Ankara piyasasından temin edilmiştir. Analitik saflıkta tuz ve glikoz ile starter kültür (*Lactobacillus sakei* ve *Staphylococcus carnosus*, FSC111, Chr. Hansen Inc., Almanya) kullanılmıştır. Sucuk dolumunda 38 mm çapında düz formda kolajen kılıf kullanılmıştır.

Tez, üç aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada, sığır karaciğerinden protein hidrolizatı elde edilmiş ve bu hidrolizatın fonksiyonel niteliğini ortaya koymak amacıyla lipit dispersiyonlarının stabilitesi belirlenmiştir. İkinci aşamada, karaciğer hidrolizatından düşük ve yüksek molekül ağırlıklı (3 ve 10 kDa’luk) peptit fraksiyonları elde edilmiş ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Üçüncü aşamada, peptit fraksiyonları ideal konsantrasyonlarda sucuk hamuruna ilave edilerek ürünün kalite özelliklerine etkisi üretim ve depolama süresince belirlenmiştir.

3.2 Sığır Karaciğerinden Hidrolizat Eldesi

Sığır karaciğeri zar ve sinir dokularından arındırılarak 3 mm boyutlarında doğranmıştır. Karaciğer hidrolizatı, Damgaard vd. (2015)'nin enzimatik hidroliz yöntemine göre elde edilmiştir. Hidrolizde Alkalaz 2.4 L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve Protamex (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) enzim karışımı 1:1 oranında kullanılmış, enzim substrat oranı 1:1000 olarak uygulanmıştır. Karışımın pH değeri 8.0 olarak ayarlandıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 12, 18 ve 24 saat süreyle hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Herbir hidroliz süresinin sonunda pH 7.0 olarak ayarlanmış ve 95°C su banyosunda 15 dakika bekletilerek enzimin inaktive olması sağlanmıştır. Hidrolizat, 20000 g'de ve 4°C'de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı, cam yününden geçirilerek lipidler ve büyük partiküller uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hidrolizat kullanılıncaya kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Hidroliz koşulları, iki faktör (zaman ve sıcaklık) ve faktörlerin 3 seviyesiyle yanıt yüzeyi yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Antioksidan aktiviteyi artırmak için yüzey-merkezli merkezi bileşen t tasarımından yararlanılarak (-1, 0 ve +1) optimum hidroliz koşulları belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler süre (12, 18 ve 24 saat) ve sıcaklık (45, 50 ve 55 °C) olup, X_1 ve X_2 olarak kodlanmıştır. Deney tasarımı, veri analizi ve 3D kontur grafikleri için Design Expert sürüm 12 yazılımı (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, ABD) kullanılmıştır. Modelin geçerliliği varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiş, karesel model için kodlu matematiksel denklem aşağıdaki gibi gösterilmiştir:

$$Y = B_0 + B_i X_i + B_j X_j + B_{ii} X_i^2 + B_{jj} X_j^2 + B_{ij} X_i X_j$$

Denklemde Y tahmini yanıtı (bağımlı değişken) temsil eder, B_0 sabit terimi temsil eder, B_i , B_{ii} ve B_{ij} sırasıyla lineer, karesel ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarıdır. X_i ve X_j bağımsız değişkenlerdir ($i = 1$ ve $j = 2$).

Optimum koşullarda hidroliz yapılarak, en yüksek antioksidan aktivite koşulunda sucuğa ilave edilmek üzere farklı molekül ağırlıklarına özgü filtrelelere sahip santrifüj tüpleri kullanılarak peptit fraksiyonları (3 kDa ve 10 kDa) üretilmiştir. Bunun için, 18°C'de saklanan hidrolizatlar 24 saat 4°C'de çözündürülmüş, Amicon® Ultra-15 (MWCO) ultra

santrifüj tüplerine (Merck Millipore, Almanya) aktarılmış ve 4000 g'de ve 4°C'de 1 saat santrifüjlenerek uygun peptit fraksiyonları elde edilmiştir. Birinci aşama üç tekrür (her seferinde bir hayvana ait karaciğer kullanılarak) olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen hidrolizat ve peptit fraksiyonları liyofilize edilmiş ve daha sonra analizlerde kullanılmak üzere -18°C'de depolanmıştır.

3.3 Hidrolizat ve Peptit Fraksiyonlarında Yapılan Analizler

3.3.1 ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite analizi

Hidrolizat ve peptitlerde radikal söndürme (2 2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) yöntemi ile antioksidan aktivite analizi Kong ve Xiong (2006)'un yöntemine göre yapılmıştır. Bunun için, 7 mM ABTS stok çözeltisinin 12-16 saat reaksiyonu sonucu elde edilen 990 µl ABTS•+ radikal çözeltisi üzerine 1 mg/ml suda çözündürülmüş 10 µl örnek ilave edilmiştir. Başlangıç (0.dakika) ve 6 dakika sonunda 734 nm'ye ayarlı spektrofotometrede (Thermo Spectronic Helios Alpha, İngiltere) absorbans değerleri kaydedilerek, % inhibisyon belirlenmiştir. Standart kurve için farklı konsantrasyonlarda troloks (0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 ve 2.0 mM) kullanılmış ve örneklerin antioksidan aktivite değerleri troloks eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAC mM/mg liyofilize örnek) olarak verilmiştir.

3.3.2 FRAP yöntemi ile antioksidan aktivite analizi

Hidrolizat ve peptitlerin demir indirgeme antioksidan kuvvetini (FRAP) belirlemek için, taze olarak hazırlanan 3 ml FRAP çözeltisi (2.5 ml 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 2.5 ml 20mM FeCl₃.6H₂O, 26 ml 30 mM asetat, pH 3.6) 37°C'ye ısıtılmış, üzerine 0.1 ml örnek ve 0.3 ml destile su ilave edilmiş ve 8 dakika sonra 593 nm'de absorbans değeri okunmuştur. Örneklerin antioksidan aktivitesi FeSO₄ kullanılarak (100-1000 µM FeSO₄.7H₂O) hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplanmış ve mM FeSO₄ eşdeğeri olarak verilmiştir (Kong ve Xiong 2006)

3.3.3 Peptit konsantrasyonu analizi

Peptit konsantrasyonu, Wang vd. (2008)'nin yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Yöntemin esası, hidroliz sonucunda oluşan α -amino gruplarının o-fitalaldehit (OPA) ve β -merkaptöetanol ile tepkimeye girmesi sonucu 340 nm'de absorbans değerinin belirlenmesine dayanır (Church vd. 1983). Seyreltilen örnekler doğrudan 2 mL OPA karışımı içerisine aktarılmış ve 4 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Peptit konsantrasyonu, glutatyon ile hazırlanan standart eğri üzerinden interpolasyonla hesaplanarak mg peptit/g liyofilize örnek olarak ifade edilmiştir.

3.3.4 SDS-PAGE analizi

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) analizi, Laemmli (1970) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatta ve peptit ekstraktlarında yapılan analizde liyofilize örnekler doğrudan deiyonize su içerisinde çözündürülmüş ve protein konsantrasyonları ayarlanmıştır. Proteinler, 30 V'de 30 dakika boyunca %12.5 çözünme jeli üzerinde ve 130 V'de 90 dakika boyunca %4 ayırma jeli üzerinde çalıştırılmıştır. Jeldeki her bir kuyu, 15 μ g proteinle yüklenmiştir. Moleküler ağırlık standartları olarak Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder (10-180 kDa aralığında) kullanılmıştır.

3.4 Karaciğer Hidrolizatının Fonksiyonel Niteliğinin Belirlenmesi

Optimum koşullarda üretilmiş (45°C'de 24 saat) karaciğer hidrolizatının fonksiyonel niteliğini ortaya koymak için lipid dispersiyonları (emülsiyon ve lipozom) hazırlanmıştır. Emülsiyonlar için 25 mM potasyum fosfat tampon çözeltisi (0.6 M NaCl içeren PBS çözeltisi, pH 6.25) ile %5 lesitin (soya fasulyesinden elde edilen %35 hidrolize L- α -fosfatidilkolin) ve %10 Tween 20 (w/w) bir gece 4°C'de çözündürülmek suretiyle iki emülsiyon için iki çeşit sulu faz hazırlanmıştır. Sulu faza %15 oranında kanola yağı, son olarak emülsiyonların fiziksel olarak stabilizasyonu için %0.04 ksantan gum eklenmiştir. Homojenizasyon işleminde yeterli düzeyde yüzey geriliminin sağlanabilmesi için

emülsiyonlar 10 gram olarak hazırlandıktan sonra karışım, 12500 g'de 2 dakika homojenize edilmiştir (Ultra-Turrax® model, IKA®WERKE, Germany). Aşırı ısınmayı önlemek için buz kullanılmıştır.

Lipozom için 8 mg/ml konsantrasyonda lesitin PBS (pH 6.25) ile 30 ml süspansiyon oluşturacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyon 4°C'de bir sonik dismembratör (model 300, Fisher Scientific, Farmingdale, NY, USA) kullanılarak 10 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur (Yang ve Xiong 2018).

Liyofilize karaciğer hidrolizatı (KH), lipozom ve emülsiyonlara farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.3 ve 0.5%) eklenmiştir. Her bir dispersiyon için oluşturulan 4 grup belirtildiği üzere kodlanmıştır: TK (Tween 20 emülsiyonu-kontrol), 1TH, 3TH ve 5TH (0.1, 0.3 ve 0.5% KH içeren Tween 20 emülsiyonları); FK (lesitin emülsiyonu-kontrol), 1FH, 3FH ve 5FH (0.1, 0.3 ve 0.5% KH içeren lesitin emülsiyonları); LK (lipozom-kontrol), 1LH, 3LH ve 5LH (0.1, 0.3 ve 0.5% KH içeren lesitin emülsiyonları). Tüm örnekler 14 gün boyunca ışığa maruz kalacak şekilde 25°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.1 Lipit dispersiyonlarında tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM) analizi

Wang ve Xiong 2005'un TBARM yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Her gruptan 100 µg örnek test tüplerine aktarılmış ve %2 BHA çözeltisinden 3 damla eklenmiştir. 1.5 mL TBA ayırıcı (0.075 M NaOH içerisinde %1'lik çözelti) ve TCA-HCl (0.036M HCl ile 8.5 mL %2.5 TCA) çözeltisi eklendikten sonra, karışım kaynar su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 2 mL'lik bir örneğe 5 mL kloroform eklenmiş, 1 dakika karıştırmanın ardından örnekler 1800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Spektrofotometre (Thermo Spectronic Helios Alpha, İngiltere) ile 532 nm'de absorbansı ölçülen örneklerin TBARM değerleri aşağıdaki denklemden yararlanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{TBARM (mg malondialdehit/kg örnek)} = (A_{532}/W_s) \times 9.48$$

Denklemden A_{532} , 532 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri, W_s örneğin ağırlığı (g) ve 9.48, molar ekstinksiyon katsayısı ($152\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) ile seyreltme faktöründen türetilen bir sabittir.

3.4.2 Lipit dispersiyonlarında konjuge dien analizi

Analiz için emülsiyon ve lipozom örneklerinden 20 μL , 10 mL izooktan/2-propanol karışımı (2:1 v/v) içeren bir test tüpüne eklenerek 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Konjuge dien içeriği, 234 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri, bağıl moleküler kütle (280 g mol^{-1}) ve linoleik asidin molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=26,000$) kullanılarak hesaplanmıştır (Kiokias vd. 2006).

3.4.3 Partikül boyutu

Emülsiyonlar ve lipozomlar, sırasıyla, 0.001 ve 0.01 mg/mL yağ damlacığı konsantrasyonuna seyreltilmiştir. Partikül boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) ölçümü için NanoZS dinamik ışık saçılımı analiz cihazı (Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere) kullanılmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmış, veriler, Z-ortalama çaplarının ortalaması (nm) olarak ifade edilmiştir (Li ve Xiong 2021).

3.5 Sucuk Üretimi

45°C’de 24 saatte hidroliz edilen sıgır karaciğerinden sucuk üretiminde kullanılmak üzere yeterli düzeyde üretilen ve liyofilize edilerek saklanan 3 kDa ve 10 kDa’luk peptit fraksiyonları sucuk formülasyonuna hem yüksek antioksidan etki sağlayacak hem de ürün kalitesini olumsuz etkilemeyecek iki farklı konsantrasyonda (%0.5 ve %1) dahil edilmiştir.

Çalışmada, %20-25 yağlı sığır eti, %1.8 tuz, %1.2 sarımsak, %0.6 glukoz, %0.5 acı kırmızı biber, %0.5 tatlı kırmızı biber, %0.6 karabiber, %0.8 kimyon, %0.025 starter kültür (*Lactobacillus sakei* ve *Staphylococcus carnosus*, FSC111, Chr. Hansen Inc., Almanya) ve %0.015 sodyum nitrit kullanılarak sucuk hamuru hazırlanmış ve 5 gruba ayrılmıştır: 1) peptit ilavesiz (kontrol), 2) <3 kDa'luk %0.5 peptit ilaveli (3P1), 3) <3 kDa'luk %1 peptit ilaveli (3P2), 4) <10 kDa'luk %0.5 peptit ilaveli (10P1) ve 5) <10 kDa'luk %1 peptit ilaveli (10P2) grup. Kolajen kılıflara (38 mm çapında) dolum yapıldıktan ve bağlandıktan sonra sucuklar (130±2 g), 20-22°C'de ve %85-92 bağıl nemde 3 gün fermentasyona, 18-20°C'de ve %75-85 bağıl nemde 9 gün kurumaya bırakılmıştır. Üretim sonunda sucuklar vakum ambalajlanmış ve 4±1°C'de 3 ay depolanmıştır. Bu aşama üç tekerrür (her bir tekerrürde aynı ırk ve yaşta farklı bir hayvandan elde edilen etler kullanılarak) gerçekleştirilmiştir. Bir tekerrürde 10 kg olmak üzere 15'er gün ara ile toplam 30 kg sucuk üretilmiştir. Analizler üretim (0., 6. ve 12. günlerde) ve depolama (1., 2. ve 3. aylarda) süresince her bir tekerrürde 3 paralel olarak yürütülmüştür.

3.5.1 Mikrobiyolojik analiz

Mikrobiyolojik analizler için, kılıf materyali steril bıçak ve pens kullanılarak uzaklaştırılmış, 10 g sucuk, aseptik koşullarda steril torbaya aktararak 90 ml steril peptonlu tuzlu su (%0.1 pepton ve %0.85 NaCl, w/v) çözeltisi ile karıştırılmış ve Stomacher'de (Seward 400, London, UK), 230 rpm'de 2.5 dakika homojenize edilmiştir. Homejenattan steril peptonlu tuzlu su çözeltisi kullanılarak ardışık seyreltiler hazırlanmıştır. Mikrobiyolojik analizler AOAC (1998)'de belirtilen yöntemlere göre planlanmıştır. Bu amaçla uygun seyreltilerden alınan hacimler plaklara aşağıda belirtilen besiyerlerine yayma (RBC agar) veya dökme (diğer besiyerleri) yoluyla ilave edilerek uygun sıcaklık koşullarında inkübe edilmiştir. Toplam aerob mezofil bakteri (TAMB) sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck 1.05463), Laktik asit bakteri (LAB) sayımı için De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Merck 1.10660) agar besiyeri, Koagülaz Negatif Kok (KNK) bakteri sayımı için Mannitol Salt Phenol Red (MSPR, Merck 1.05404) besiyeri, *Enterobacteriaceae* sayımı için Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBDA, Merck 1.10275), maya ve küf sayımı için Rose Bengal Chloramphenicol (RBC, Merck 1.00467)

besiyeri kullanılmıştır. Plaklar TAMB ve LAB gelişimi için 28°C de 48 saat, KNK için 35°C de 48 saat, *Enterobacteriaceae* gelişimi için 35°C’de 24 saat ve maya-küf gelişimi için 25°C de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.2 Bileşim ve pH analizleri

Sucuklarda nem miktarı (950.46), protein miktarı (955.04), yağ miktarı (991.36) ve kül miktarı (920.153) analizleri AOAC (2010)’da belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır. pH analizi için, 10 g sucuk örneği 100 ml destile su ile ultra-turrax (Polytron PT 10-35 GT-D, Kinematica, İsviçre) kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatın pH ölçümü, 4, 7 ve 9 pH değerine sahip tampon çözeltiler ile kalibre edilmiş pH metre (Model S220, Mettler-Toledo, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır.

3.5.3 Renk ölçümü

Sucuk kesit yüzeyinde renk, Minolta renk ölçüm cihazı (CR300, Osaka, Japan) kullanılarak yapılmıştır. Sucuk örneklerinde L^* (açıklık-koyuluk), a^* (kırmızılık) ve b^* (sarılık) değerleri 0., 6. ve 12. günlerde belirlenmiştir. Beş farklı noktadan yapılan ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak renk değeri hesaplanmıştır.

3.5.4 Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM) analizi

TBARM için, kıyma haline getirilen 5 g sucuk örneği 15 ml destile su ile 15 s homojenize edilmiştir (Polytron PT 10-35 GT-D, Kinematica, İsviçre). Homojen örnekler 2000 g’de 10 dakika santrifüjlendikten (Hermle Z326K, Almanya) sonra süpernatanttan 1 ml alınarak cam deney tüpüne aktarılmıştır. Üzerine TCA-TBA-HCl (%15 TCA w/v, %0.375 w/v, 0.25 M HCl) reaktif çözeltisinden 2 ml eklenmiş ve karışım su banyosunda 15 dakika renk gelişimi için bekletilmiştir. Soğuyan tüpler 2000 g’de 15 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısmın absorbansı 531 nm dalga boyunda şahit çözeltiye karşı okunmuştur. TBARM miktarı, 1,1,3,3-tetra-etoksipropan (TEP) kullanılarak çizilen standart kurve üzerinden kg ette mg malondialdehit olarak hesaplanmıştır (Ahn vd. 1998).

3.5.5 Toplam sülfidril analizi

Protein oksidasyonunu izlemek üzere sülfidril analizi Eymard vd. (2009)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Toplam sülfidril miktarı için, 0.5 g sucuk örneği 10 ml fosfat buffer ile homojenize edilmiştir. Homojenattan 1 ml alınarak 9 ml üre buffer çözeltisi ile karıştırılmış, 14000 g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Disposable küvetlere 3 ml süpernatant ve 0.04 ml DTNB çözeltisi ilave edildikten sonra 40°C'de 25 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 412 nm dalga boyunda şahit çözeltiye karşı okunmuş ve sülfidril miktarı örneğin protein içeriği üzerinden hesaplanarak nmol sülfidril/mg protein olarak verilmiştir. Örneğin protein miktarının belirlenmesinde biüre yönteminden yararlanılmıştır (Gornall vd. 1949, Ryan ve Chopra 1976)

3.5.6 SDS PAGE

Myofibriler protein ekstraksiyonu için önce sarkoplazmik proteinler ayrılmıştır. Bu amaçla, kıyma haline getirilmiş 10 g et örneği 40 mL 0,03 M potasyum-fosfat tampon çözeltisi ile 3 dakika boyunca homojenize edilmiş, ardından 12000 g'de 4°C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantın cam yününden iki defa süzülmesi ile sarkoplazmik proteinler ayrılmıştır. Pelet 40 ml 8 M üre tampon çözeltisi ile homojenize edildikten sonra 12000 g'de 4°C'ta 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantın cam yününden süzülmesiyle miyofibriler protein ekstraktı elde edilmiştir. Ekstraktların protein konsantrasyonu 1 mg/mL olarak ayarlanmış ve her bir gruptan elde edilen proteinler kuyulara 20 µg olacak şekilde yüklenmiştir. Proteinler, 30 V'de 25 dakika boyunca %12.5 çözünme jeli üzerinde ve 130 V'de 75 dakika boyunca %4 ayırma jeli üzerinde çalıştırılmıştır. Moleküler ağırlık standartları olarak Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder (10-180 kDa aralığında) kullanılmıştır.

3.5.7 Duyusal analiz

Üretim sonunda sucuklar renk, tat, koku, tekstür ve genel beğeni yönlerinden puanlandırılmıştır. Panel öncesi verilen eğitimde, koku yönünden değerlendirme yaparken kapaklı kaplarda bulunan sucuk dilimlerini, kapakları açar açmaz koklamaları ve örnekler arası geçiş yaparken kahve koklayarak bir önceki kokunun etkisini gidermeleri istenmiştir. Örneklerin kesit yüzey renklerini bir arada değerlendirmeleri gerektiği anlatılmıştır. Tat yönünden değerlendirme yaparken sucuğun karakteristik asidik lezzetinin yüksek puanlanması ve yabancı tat algılanması halinde düşük puanlanması gerektiği belirtilmiştir. Sucuk tekstürünü değerlendirirken örnekleri iyice çiğnemeleri istenmiş, tat ve tekstür değerlendirmelerinde bir önceki örneğin ağızda bıraktığı etkiyi gidermek için galeta ve su tüketmeleri gerektiği anlatılmıştır. Genel olarak en beğendikleri örnekleri daha yüksek puanlandırmaları, çiğ ve pişmiş olarak sunulan örnekleri 10 puanlık hedonik ölçek üzerinde (10 en iyi, 0 en kötü) puanlamaları istenmiştir (Demirok Soncu vd. 2020).

3.5.8 Peptit ekstraksiyonu

Peptit ekstraksiyonu için, Mora vd. (2015)'nin yöntemi esas alınarak, 10 g sucuk örneği 40 ml 0.01 N HCl ile homojenize edilmiş, deproteinizasyon işleminin ardından liyofilize edilmiştir. Peptit konsantrasyonu ve antioksidan aktivite analizlerinde kullanılmak üzere -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.9 Sucuktan elde edilen peptit ekstraktında antioksidan aktivite analizi

Çalışmanın birinci aşamasında (bölüm 3.3.1 ve bölüm 3.3.2) hidrolizat ve peptit fraksiyonlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yararlanılan ABTS ve FRAP yöntemleri uygulanmıştır.

3.5.10 Peptit konsantrasyonunun belirlenmesi

Peptit ekstraktlarında peptit konsantrasyonu, bölüm 3.3.3'te belirtilen yöntemle uygun olarak belirlenmiştir.

3.5.11 SDS PAGE

Peptit ekstraktlarında üretim ve depolama süresince protein degradasyonu bölüm 3.3.4'te belirtilen yöntemle uygun olarak belirlenmiştir.

3.6 İstatistik Analiz

Birinci, ikinci ve üçüncü aşamalarda elde edilen sonuçlar ayrı ayrı istatistik analizlerle değerlendirilmiştir. Çalışma 3 tekrerrür ve her tekrerrürde analizler 2-3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 3 farklı sıcaklık ve sürede hidroliz sonucu elde edilen karaciğer hidrolizati ile 3 kDa ve 10 kDa fraksiyonların antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonları Varyans Analiz Tekniği ile değerlendirilerek, örnekler arasındaki farklılık Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. İkinci aşamada, lipit dispersiyonlarında 0., 7. ve 14. günlerde alınan örneklerle ait analiz sonuçları her bir dispersiyon sistemi için ayrı olarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Üçüncü aşamada ise analizler %0.5 ve %1 konsantrasyonlarda 3 kDa ve 10 kDa'luk peptit fraksiyonlarını içeren ve içermeyen sucuklarda (toplam 5 grup) üretimin 0., 6. ve 12. günlerinde yürütülmüştür. Ayrıca 3 aylık depolama süresince analizler 30 gün ara ile tekrarlanmıştır. Lipit dispersiyonlarında, sucuk ve peptit ekstraktlarında yapılan analizler tekrarlanan ölçüm düzeninde tesadüf bloklarında faktöriyel deneme düzeninde Varyans Analiz Tekniği (ANOVA) uygulanarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara ait farklılıklar $\alpha=0.05$ önem seviyesinde Tukey's çoklu karşılaştırma testinden yararlanılarak belirlenmiştir. Analizlerde SPSS 28 (SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D) ve MSTAT istatistik paket programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

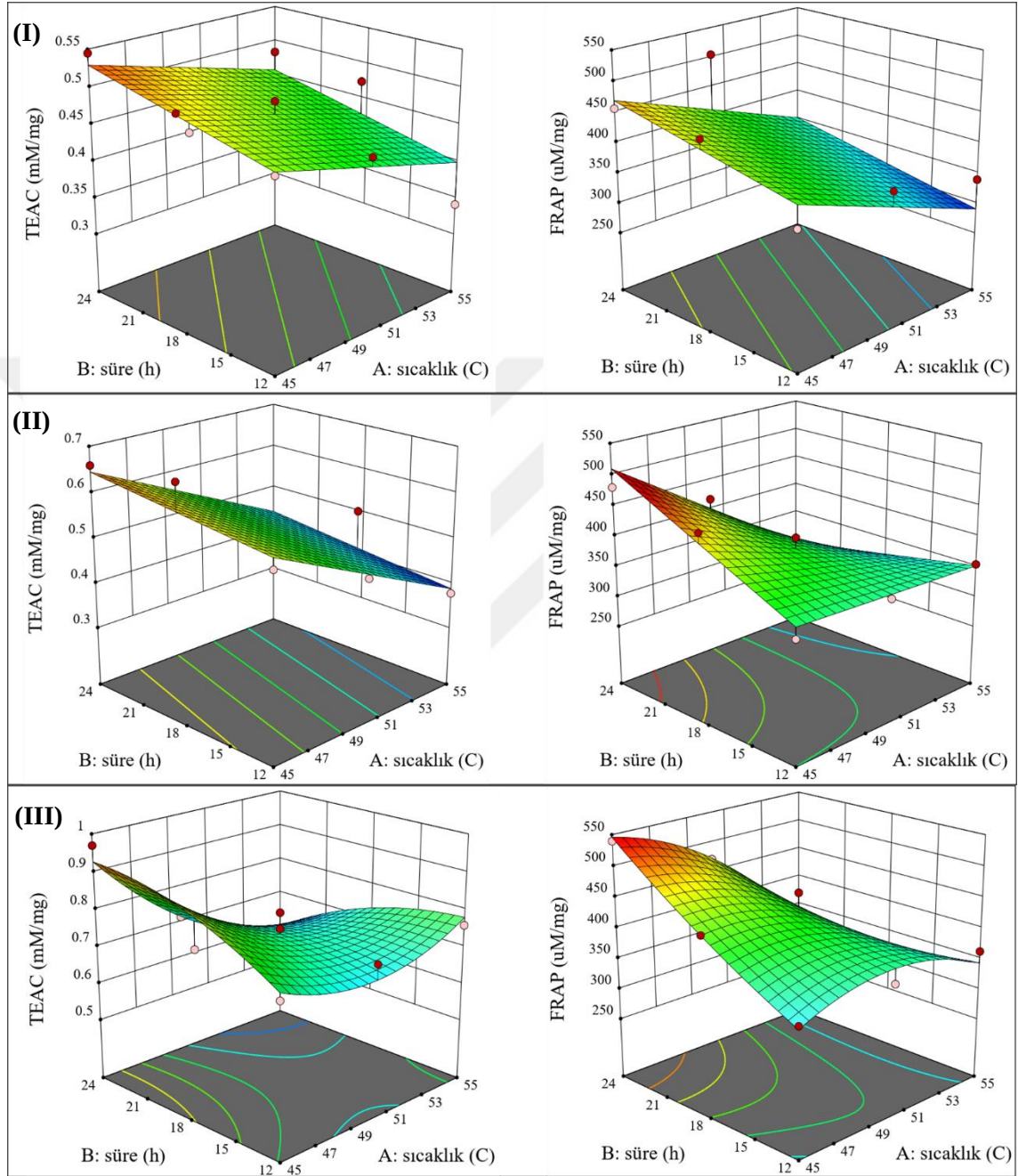
4.1 Sığır Karaciğerinde Enzimatik Hidroliz İşleminin Optimizasyonu

Karaciğer hidrolizatı ve düşük molekül ağırlığında peptit fraksiyonlarına ait kontur plot grafikleri şekil 4.1'de gösterilmektedir. Hidrolizat ve her bir peptit fraksiyonu için optimum koşullar 45°C'de 24 saat hidroliz olarak belirlenmiştir. Yanıt değişkeni antioksidan aktivite olan grafiklerde görüldüğü üzere hidroliz sıcaklığı ve süresinin önemli düzeyde etkisi vardır ($P<0.05$). Sığır karaciğerinin 50 ve 55°C'de hidrolizi, 0.61-0.74 TEAC mM/mg aralığında serbest radikal söndürme aktivitesine (RSA) sahiptir (Çizelge 4.1). Hidrolizatın antioksidan aktivitesi 45°C'de gerçekleştirilen hidroliz işleminde daha yüksek seviyede belirlenmiştir. Hidroliz süresinin artmasıyla, hidroksil radikallerine karşı daha yüksek yakalama etkisi sağlanmıştır.

Benzer şekilde, hidrolizatın demir indirgeme gücü, 45 ve 50°C'de daha uzun hidroliz süresi sonucunda artmıştır. En yüksek FRAP değerleri sırasıyla 45 ve 50°C'de 24 saat sonra 0.54 ± 0.06 ve 0.50 ± 0.01 mM FeSO₄ olarak ölçülmüştür. Yanıt yüzey yöntemine göre karaciğerin hidrolizi için en uygun koşul, 24 saatte 45°C olarak belirlenmiştir. Hidrolizatlara ait antioksidan aktivite sonuçları için uygulanan çoklu karşılaştırma testi, yüzey yanıt yöntemi tarafından oluşturulan çözümlerle ilişkilendirilmiştir. Antioksidan aktivite değerleri üzerindeki süre (X1) ve sıcaklık (X2) etkileri Şekil 4.A'da gösterilmiştir. Her iki bağımsız değişken de antioksidan aktivite için önemliyken modelin P değeri oldukça düşük bulunmuştur ($P<0.01$). Bu değer düşük olması güçlü istatistiksel anlamlılığı gösterirken, RSA (0.0707) ve FRAP (0.5452) yanıtızsızlık uyumsuzluğu da modelin uygulanabilirliğini ortaya koymuştur. Düzeltilmiş R² istatistiği modelin, RSA sonuçlarının %86.46'sını ve FRAP değerlerinin %80.33'ünü açıkladığını göstermiştir.

Şekil 4.1'de gösterildiği üzere, bağımsız değişkenler (süre ve sıcaklık) ile yanıt değişkenleri (ABTS ve FRAP ölçümleri) arasındaki ilişkiyi 3 kDa (Şekil 4.1, I) ve 10 kDa (Şekil 4.1, II) molekül ağırlığındaki peptit fraksiyonları için görsel olarak açıklamaktadır. Karaciğer hidrolizatından (Şekil 4.1, III) üretilen peptitler için,

antioksidan aktiviteyi en üst düzeye çıkaran en uygun koşulların her iki durumda da 45°C'de 24 saatlik hidroliz olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4.1 3 kDa (I) ve 10 kDa (II) peptid fraksiyonlarında ve hidrolizatta (III) ABTS ve FRAP antioksidan aktivite analizleri için hidroliz süresine (X1: saat) karşı hidroliz sıcaklığının (X2: °C) 3D kontur grafikleri

Araştırmacılar, alkalaz ve protamex enzimlerini kullanarak protein hidrolizinin farklı pH, sıcaklık, E/S (enzim:substrat) oranı ve sürelerini uygulamışlardır. Enzim seçimi, elde edilen hidrolizatların veya peptitlerin işlevselliğiyle hidroliz koşulları kadar doğrudan ilişkilidir. Genel olarak, protamex, geniş spektrumlu endo-proteazlara ve peptit bağlarına düşük özgünlüğe sahip olması nedeniyle hayvansal protein hidrolizinde oldukça tercih edilmektedir (Zheng vd. 2015). Alkalaz, öncelikli olarak aromatik amino asit kalıntılarını içeren peptit bağlarını parçalamaktadır (Cui vd. 2021). Bu nedenle, Alkalaz ve Protamex'in birlikte kullanımı, farklı protein kaynaklarından antioksidan aktiviteye sahip daha küçük peptitlerin üretilmesini sağlayabilir (Shen vd. 2008, Liang vd. 2021, Jia vd. 2022).

Primer amino grubu miktarı peptit konsantrasyonunu temsil ederken (Nielsen vd. 2001), protein ve polipeptitlerin Coomassie mavisi reaktifi ile bağlanması protein miktarını belirtmektedir (Bradford 1970). Bu doğrultuda, ABTS ve FRAP sonuçlarıyla uyumlu olarak, 45°C'de 24 saatte üretilen hidrolizatta en yüksek peptit konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu parametreyi 50°C'de 18 ve 24 saatte gerçekleştirilen hidrolizler sonucu ulaşılan peptit konsantrasyonları takip etmiştir. Optimum koşullarda elde edilen yüksek peptit konsantrasyonu ve düşük protein miktarı, hidroliz verimliliğini göstermiştir. 55°C'de gerçekleşen hidroliz, 45 ve 50°C ile karşılaştırıldığında protein miktarının yüksek olmasına neden olmuştur. Bu olgu, muhtemelen ilgili enzimler arasında optimal çalışma sıcaklıklarındaki farklılıklardan kaynaklanan, belirli bir enzimin baskınlığına atfedilebilir. Protamex enziminin 55°C'de nispeten düşük aktivitesi, parçalanmamış protein miktarının daha yüksek olmasından sorumlu olabilir (Çizelge 4.1). Cui vd. (2021), süt proteini hidrolizinde Protamex kullanılması ile 10 kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip polipeptitlerin oluştuğunu, alkalaz kullanımı ile daha ileri bir degradasyon elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle, Protamex, düşük molekül ağırlığındaki peptitlerin (<10 kDa) korunmasından sorumlu enzim olabilir. Dolayısıyla, hidroliz sıcaklığı, farklı enzimlerin birlikte kullanılması halinde, enzim aktivitelerinin dengelenmesini etkileyen kritik bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Karaciğerin 45°C'de 24 saatlik hidrolizi, ~10 kDa molekül ağırlığında peptitlerin üretimine ve dolayısıyla antioksidan aktiviteye katkıda bulunmuş olabilir. 55°C'deki işlem sonucunda küçük peptitler muhtemelen serbest amino asitlere parçalanmış olabilir. Bu da düşük antioksidan aktivitenin nedeni

olabilir. Öte yandan, 50°C'deki hidroliz, küçük peptitlerden ziyade polipeptitlerin üretimi ile sonuçlanmıştır. Dolayısıyla, optimal koşullarda üretilen karaciğer hidrolizatının yüksek antioksidan aktivitesinin muhtemel açıklamalarından biri, literatürde sıkça bahsedildiği üzere, molekül ağırlığı düşük peptit içeriğine sahip olmasıdır.

Çizelge 4.1 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerin antioksidan aktivite, peptit konsantrasyonu ve protein miktarı sonuçları

Grup	ABTS (TEAC mM/mg liyofilize örnek)	FRAP (mM FeSO ₄)	Peptit konsantrasyonu (µg peptit/mg liyofilize örnek)	Protein miktarı (µg/ml)
55T-12h	0.76±0.04 ^{bc}	0.36±0.06 ^{bc}	131.66±0.05 ^{bc}	376±0.00 ^{bc}
55T-18h	0.71±0.03 ^{bc}	0.30±0.06 ^c	125.24±0.06 ^d	454±0.02 ^a
55T-24h	0.64±0.02 ^c	0.33±0.06 ^{bc}	130.87±0.03 ^{cd}	418±0.01 ^{ab}
50T-12h	0.74±0.02 ^{bc}	0.36±0.01 ^{bc}	128.97±0.02 ^{cd}	419±0.00 ^{ab}
50T-18h	0.75±0.04 ^{bc}	0.46±0.04 ^{ab}	136.33±0.02 ^b	342±0.02 ^{cde}
50T-24h	0.61±0.07 ^c	0.50±0.01 ^a	136.13±0.02 ^b	306±0.01 ^{de}
45T-12h	0.74±0.04 ^{bc}	0.36±0.02 ^{bc}	130.60±0.01 ^{cd}	352±0.01 ^{cd}
45T-18h	0.86±0.03 ^{ab}	0.44±0.01 ^{ab}	136.06±0.05 ^b	242±0.01 ^f
45T-24h	0.97±0.01 ^a	0.54±0.06 ^a	142.45±0.00 ^a	295±0.01 ^e

55T, 50T ve 45T, sırasıyla 55, 50 ve 45°C'de hidroliz sıcaklıklarını; 12h, 18h ve 24h, sırasıyla 12, 18 ve 24 saatlik hidroliz süresini göstermektedir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfler, her sütunda anlamlı farklılıkları (P<0.05) göstermektedir.

Çizelge 4.2 ve çizelge 4.3, sırasıyla karaciğer hidrolizatından elde edilen 3 ve 10 kDa fraksiyonlarda ölçülen antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu değerlerinin hidroliz süresi ve sıcaklığından önemli düzeyde etkilendiğini göstermektedir (P<0.05). ABTS ve FRAP analiz sonuçları, uzun hidroliz süresinin tüm sıcaklık derecelerinde daha yüksek antioksidan aktivite sağladığını göstermiştir. Ayrıca, en yüksek peptit konsantrasyonları, sırasıyla 45 ve 50°C'de 24 ve 18 saatlik hidroliz sonucunda elde edilen 3 kDa peptit fraksiyonlarında belirlenmiştir. Benzer şekilde, uzun hidroliz sürelerinin 10 kDa peptit fraksiyonlarındaki peptit konsantrasyonları üzerinde olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir. 55°C'de gerçekleştirilen hidroliz işlemi sonucunda 3 kDa peptit fraksiyonlarında daha düşük peptit konsantrasyonları belirlenmiş ve bu fraksiyonların düşük antioksidan aktivite göstermesi, peptit konsantrasyonunun düşük olması ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerden elde edilen 3 kDa molekül ağırlığında peptitlere ait antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu sonuçları

Grup	3 kDa		
	ABTS (TEAC mM/mg liyofilize örnek)	FRAP (mM FeSO ₄)	Peptit konsantrasyonu (µg peptit/mg liyofilize örnek)
55T-12h	0.43±0.02 ^d	0.34±0.05 ^{bc}	123.50±0.20 ^b
55T-18h	0.47±0.01 ^{bcd}	0.28±0.04 ^c	139.58±0.05 ^{ab}
55T-24h	0.48±0.01 ^{bcd}	0.31±0.04 ^c	139.24±0.08 ^{ab}
50T-12h	0.45±0.01 ^{cd}	0.37±0.02 ^{bc}	140.86±0.04 ^{ab}
50T-18h	0.52±0.01 ^{ab}	0.36±0.02 ^{bc}	144.92±0.02 ^a
50T-24h	0.51±0.02 ^{ab}	0.50±0.01 ^a	141.98±0.03 ^{ab}
45T-12h	0.42±0.02 ^{bcd}	0.37±0.03 ^{bc}	131.12±0.10 ^{ab}
45T-18h	0.46±0.02 ^{bc}	0.45±0.01 ^{ab}	134.50±0.02 ^{ab}
45T-24h	0.59±0.00 ^a	0.46±0.03 ^{ab}	145.76±0.05 ^a

55T, 50T ve 45T, sırasıyla 55, 50 ve 45°C'de hidroliz sıcaklıklarını; 12h, 18h ve 24h, sırasıyla 12, 18 ve 24 saatlik hidroliz süresini göstermektedir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfler, her sütunda anlamlı farklılıkları (P<0.05) göstermektedir.

Enzimatik hidrolizle elde edilen peptitlerin antioksidan aktivitesi, E/S oranı, pH, süre ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ancak, bu faktörler arasında, hidroliz süresi ve sıcaklığın etkisinin nispeten daha az olduğu bulunmuştur (Yang vd. 2020). Alkalaz ve Protamex, özellikle hayvansal ve deniz ürünü kaynaklarından antioksidan peptitler üretme yetenekleriyle bilinmektedir (Ahn, vd. 2012). Bu özellikleri, çeşitli peptitlerin üretilmesini sağlayan endo-peptidaz aktivitelerine bağlanabilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, hidroliz işleminde enzimlerin birlikte kullanımının her zaman bir optimizasyon gerektirdiğini göstermektedir. Çünkü, süreçte kullanılan her enzimin farklı optimal çalışma koşulları vardır ve bu koşullar aynı zamanda kullanılan substrat çeşidine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Martinez vd, (2023), alkalaz enzimi ile sığır akciğerinin 50-60°C'de (pH 7.5-8.5) 120 dakika hidrolizi ile yüksek antioksidan aktivite elde edildiğini ortaya koymuştur. Borrajo vd. (2020), domuz karaciğerinin alkalaz ile 8 saatlik enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen 5 ve 10 kDa peptitlerde ABTS yöntemiyle ölçülen antioksidan aktivitelerini sırasıyla 815 ve 1068 mg askorbik asit/100 g örnek olarak bildirmiştir. FRAP yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri ise, 5 ve 10 kDa peptitler için sırasıyla 43.3 ve 62.4 (µmol Fe⁺²/100 g) olarak belirtilmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmasında 45°C'de 24 saatte üretilen 3 ve 10 kDa peptitlerin ABTS yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları ile benzerlik göstermekte olup, 10

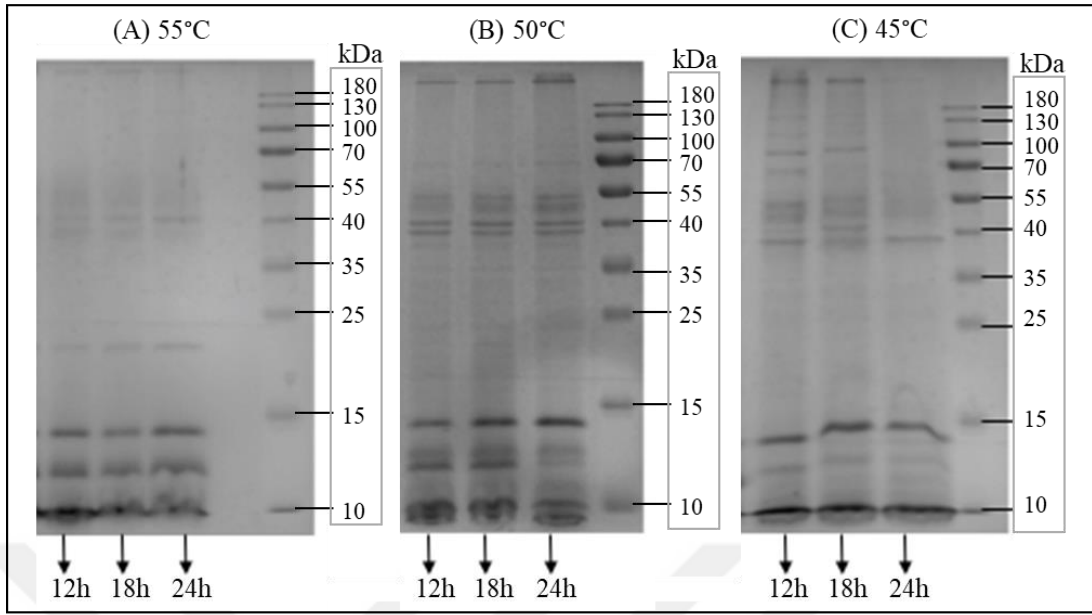
kDa peptitlerin antioksidan aktivitesi 3 kDa peptitlerin antioksidan aktivitesinden daha yüksektir ($P<0.05$).

Çizelge 4.3 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğerden elde edilen 10 kDa molekül ağırlığında peptitlere ait antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu değerleri

Grup	10 kDa		
	ABTS (TEAC mM/mg liyofilize örnek)	FRAP (mM FeSO ₄)	Peptit konsantrasyonu (µg peptit/mg liyofilize örnek)
55T-12h	0.44±0.02 ^c	0.35±0.07 ^{abc}	141.20±0.02 ^a
55T-18h	0.50±0.02 ^{bc}	0.30±0.08 ^{bc}	142.25±0.02 ^a
55T-24h	0.48±0.01 ^c	0.28±0.06 ^c	121.31±0.02 ^b
50T-12h	0.38±0.02 ^c	0.35±0.01 ^{abc}	138.90±0.02 ^a
50T-18h	0.53±0.01 ^{bc}	0.40±0.02 ^{abc}	140.46±0.02 ^a
50T-24h	0.54±0.01 ^{bc}	0.42±0.04 ^{abc}	141.74±0.02 ^a
45T-12h	0.54±0.01 ^{bc}	0.35±0.02 ^{abc}	131.88±0.02 ^{ab}
45T-18h	0.65±0.01 ^{ab}	0.45±0.02 ^{ab}	131.48±0.02 ^{ab}
45T-24h	0.73±0.02 ^a	0.48±0.06 ^a	140.29±0.02 ^a

55T, 50T ve 45T, sırasıyla 55, 50 ve 45°C'de hidroliz sıcaklıklarını gösterir; 12h, 18h ve 24h, sırasıyla 12, 18 ve 24 saatlik hidroliz süresini gösterir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Farklı harfler, her sütunda anlamlı farklılıkları ($P<0.05$) gösterir.

Şekil 4.2'de farklı süre ve sıcaklıklarda hidroliz edilen sığır karaciğerine ait SDS-PAGE görseli yer almaktadır. 55°C'de yapılan hidroliz, 55 kDa'dan büyük polipeptitlerin parçalanmasına neden olmuştur. 50°C'de (12-24 saat) ve 45°C'de (12 ve 18 saat) üretilen hidrolizatlarda 180 kDa üzerindeki protein bantları belirgin haldedir. A jelinde 35-55 kDa aralığındaki bantların düşük yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir. Aynı molekül ağırlığındaki bu bantların yoğunluğu B ve C jellerinde daha yüksektir. 55°C'de üretilen hidrolizata ait jelde 15 kDa'un altındaki bantlar 50°C ile kıyaslandığında daha düşük yoğunluktadır. A jelinde ~22 kDa molekül ağırlığına sahip polipeptitler görünürken, bunlar B ve C jellerinde görselleştirilmemiştir. Bununla birlikte, 10-15 kDa bantlarının yoğunluğu 50 °C'de, 55 ve 45 °C'ye kıyasla daha yüksektir. 50°C'de 12 ve 18 saat sonunda üretilen hidrolizatlarda ~12 kDa molekül ağırlığına sahip peptitler yüksek yoğunlukta görülmektedir. Bu bant 24 saatlik hidroliz sonucu kaybolmuştur. 45°C'de genel olarak düşük bant yoğunlukları görülmektedir. Bu durum polipeptitlerin önemli düzeyde parçalandığının bir göstergesidir.



Şekil 4.2 Farklı koşullarda hidroliz edilen karaciğer hidrolizatlarında protein degradasyonunu gösteren SDS-PAGE görseli

Karaciğerin 45°C'de 24 saat hidrolizi, ~10 kDa olan düşük molekül ağırlıklı peptitlerin oluşumuna ve bu da antioksidan aktiviteye katkıda bulunmuş olabilir. Çünkü 55°C'de hidroliz işlemi küçük peptitlerin olası serbest amino asitlere ayrışmasına yol açmış, 50°C'de yapılan hidroliz ise daha çok büyük polipeptitlerin oluşumuna neden olmuştur. Dolayısıyla, hidrolizatın yüksek antioksidan aktivitesinin (45°C, 24 saat) bir muhtemel açıklaması, literatürde sıklıkla belirtildiği üzere düşük molekül ağırlıklı peptit içeriğidir (Bechaux vd. 2019, Ji vd. 2019).

4.2 Karaciğer Hidrolizatının Fonksiyonel Özelliklerine Ait Lipit Dispersiyonlarında Yapılan Analiz Sonuçları

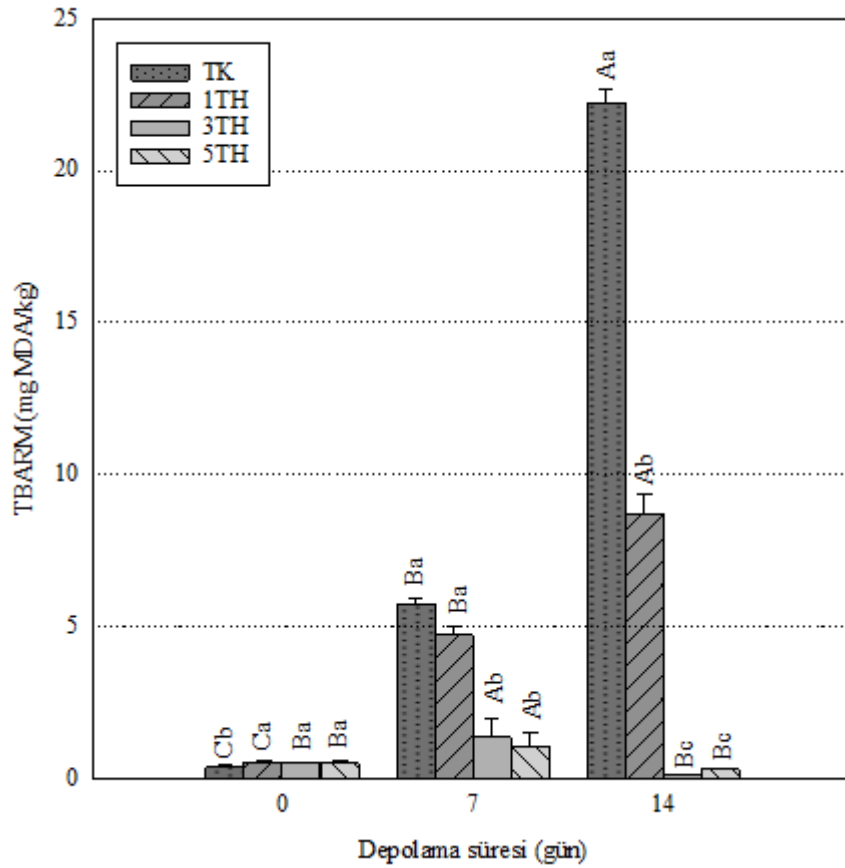
Enzimatik olarak elde edilen karaciğer hidrolizatlarının fonksiyonel özellikte olup olmadığını anlamamanın yollarından biri, antioksidan özelliğinin olup olmadığının ortaya konulmasıdır. Bunun için iki farklı lipit dispersiyon ortamı seçilmiştir. Emülsifikasyon tekniği genel olarak oksidasyona zemin hazırlayan bir işlemdir. Ancak çeşitli gıdaların üretiminde sıklıkla uygulanmaktadır. Sulu faz içerisinde yer alan ve emülsifikasyona dahil olmayan antioksidanların, emülsiyon stabilitesini emülsiyon ara yüzeyinde yer alan antioksidan özellikli emülsifiyerlere göre daha başarılı şekilde artırdığı bildirilmiştir

(Berton-Carabin vd. 2014). Son yıllarda lipozom ve emülsiyonların, peptitlerin uzun dönemde stabilitesini ve fonksiyonel özelliklerini koruyabilecek taşıyıcı sistemler olarak kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Proteinlerden farklı olarak hidrolizatlar, aktif grupları daha erişilebilir olduğu için prooksidanlara daha kolay bağlanırlar ve oksidasyon reaksiyonlarının yavaşlatılmasını sağlarlar (Karami ve Akbari-adergani 2019). Hidrolizat ve peptitlerin taşıyıcısı olarak kullanılabilmesi için öncelikle bu sistemlerde etkinliğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle hidrolizatın fonksiyonel niteliğinin araştırılması için emülsiyon ve lipozom sistemleri tercih edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki karaciğer hidrolizatı ilave edilmiş lipit dispersiyonlarının oksidatif stabilitesi, 20-25°C'de 14 günlük depolama süresi boyunca primer (konjuge dien) ve sekonder (malondialdehit) oksidasyon ürünlerinin oluşumu izlenerek değerlendirilmiştir. Emülsiyon ve lipozomların partikül boyutu depolama süresince izlenerek emülsiyonun fiziksel stabilitesi değerlendirilmiştir. Yapılan tüm analizlerde depolama süresi ve hidrolizat ilavesi arasında interaksiyon olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

4.2.1 TBARM

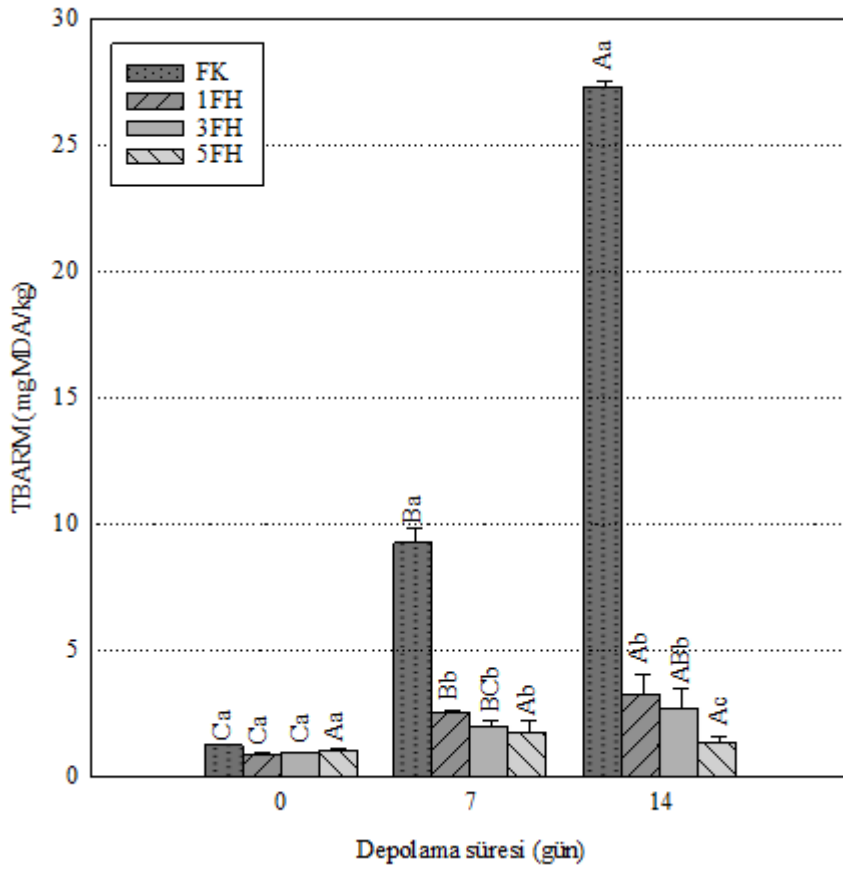
Emülsiyon ve lipozomların TBARM sonuçları hidrolizat ilavesi ve depolama süresi interaksiyonundan etkilenmiştir ($P<0.01$). Tween-20 emülsiyonlarına ait TBARM miktarlarında meydana gelen değişim şekil 4.3'te gösterilmiştir. Hidrolizat ilave edilmeyen örneklerde lipit oksidasyonu daha hızlı artış göstermiştir. Tüm gruplarda TBARM miktarları 7. günde artma eğilimindedir ($P<0.01$). Tween-20 emülsiyonunda düşük hidrolizat konsantrasyonu (1TH), 7. günde lipit oksidasyonu üzerinde etkili olmamıştır. %0.1 hidrolizat ilavesi, yüksek konsantrasyonlara kıyasla daha az etkili olsa da, depolama süresinin sonunda kontrol (22.21 mg MDA/kg) ile karşılaştırıldığında lipit oksidasyonunu yavaşlatmıştır (8.71 mg MDA/kg). Lipit oksidasyonu en yavaş 0.3 ve 0.5% hidrolizat ilaveli emülsiyonlarda gerçekleşmiş, 3TH ve 5TH'da TBARM değerleri sırasıyla 1.38 ve 1.08 mg MDA/kg'dan (7. gün), 0.16 ve 0.33 mg MDA/kg'a (14. gün) düşmüştür.



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim

TK, kontrol; 1TH, 3TH ve 5TH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren Tween-20 emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları ($P < 0.01$); a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Lesitin emülsiyonlarında, sadece kontrol grubunda (1.28'den 27.26 mg MDA/kg'a) keskin bir TBARM artışı gözlenmiştir ($P < 0.01$) (Şekil 4.4). Bu durum, konsantrasyona bağlı olmaksızın hidrolizatların lipid oksidasyonu üzerindeki etkinliğini göstermiştir. Tween-20 ile hazırlanan emülsiyonların aksine, 0.1% hidrolizat bile lesitin emülsiyonlarında lipid oksidasyonunu geciktirmede başarılı olmuştur.

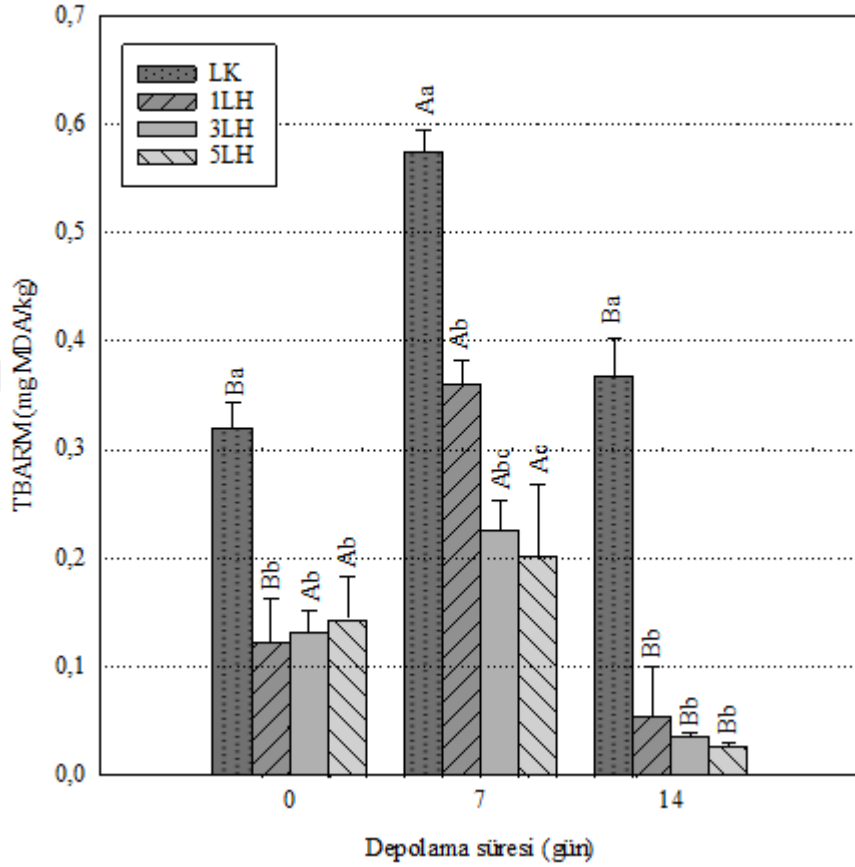


Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim

FK, kontrol; 1FH, 3FH ve 5FH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lesitin emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Oksidasyonun en yüksek seviyesine, LK ve 1LH'de 7. günde ulaşılmıştır. 5LH'da daha düşük TBARM değerlerinin belirlenmiş olması yüksek hidrolizat konsantrasyonunun lipid oksidasyonunu geciktirmede başarılı olduğunu göstermektedir. Depolama süresinin sonunda, tüm hidrolizat konsantrasyonları benzer şekilde TBARM değerlerini düşürmüştür. K grubunda TBARM değerinde meydana gelen azalma ise lesitin antioksidan etkisi ile ilişkili olabilir. Konsantrasyona bağlı olmaksızın, hidrolizat içeren lipozomlar kontrol grubundan daha düşük TBARM değerlerine sahiptir. Kontrol grubunda 0.37 mg MDA/kg iken, hidrolizat içeren lipozomlarda TBARM değerleri 0.05 mg MDA/kg'nin altında belirlenmiştir. KH'nın lipozom sisteminde antioksidan aktivite

göstermesi ve bunu sürdürebilmesi, gıdalarda matriks ile etkileşimini önlemek ve yapıyı korumak amacıyla lipit dispersiyon sistemlerinde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların sırasında TBARM sayılarında meydana gelen değişim

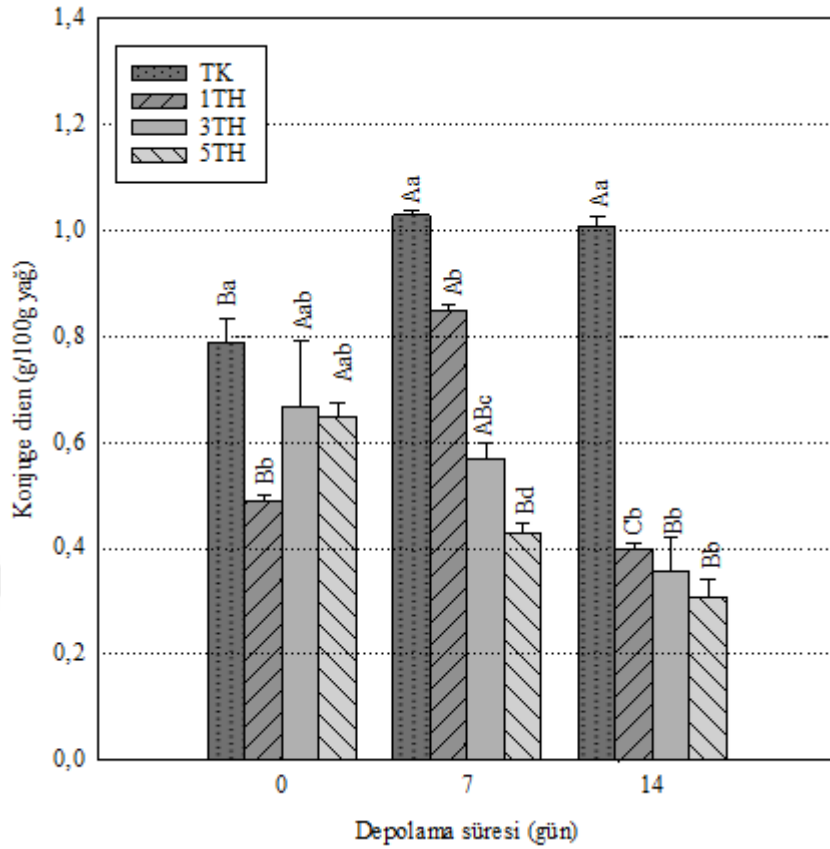
LK, kontrol; 1LH, 3LH ve 5LH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lipozomlar. A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Emülsiyonlardan farklı olarak, lipozomların başlangıçta yüksek TBARM değerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Yang ve Xiong 2018). Ancak, bu çalışmadan elde edilen başlangıç TBARM değerleri, literatürde bildirilen verilerin aksine daha düşüktür. Bu durum, sonikasyon parametrelerimiz arasında düşük süspansiyon hacminin (30 ml) daha iyi sıcaklık kontrolü ve daha kısa süreli sonikasyon sağlamış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Araştırmacılar tarafından bildirildiği üzere, lipit dispersiyonlarına ilave edilen protein hidrolizatlarının konsantrasyonları arttıkça TBARM değerlerinde azalma gözlenmiştir. Bitkisel protein hidrolizatlarının çeşitli lipit dispersiyonlarında antioksidan olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen, hayvansal protein hidrolizatlarının kullanıldığı çalışmaların sayısı sınırlıdır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, domuz kemiği hidrolizatlarının, soya fasulye yağı ve Tween-20 ile hazırlanan emülsiyonlarda lipit oksidasyonunu geciktirme etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Hidrolizatlar emülsiyon hazırlığına dahil edilmesine rağmen, hidrolizat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte primer ve sekonder oksidasyon ürünleri düzeyinde düşüş görülmüştür (Liu vd. 2018).

4.2.2 Konjuge dien

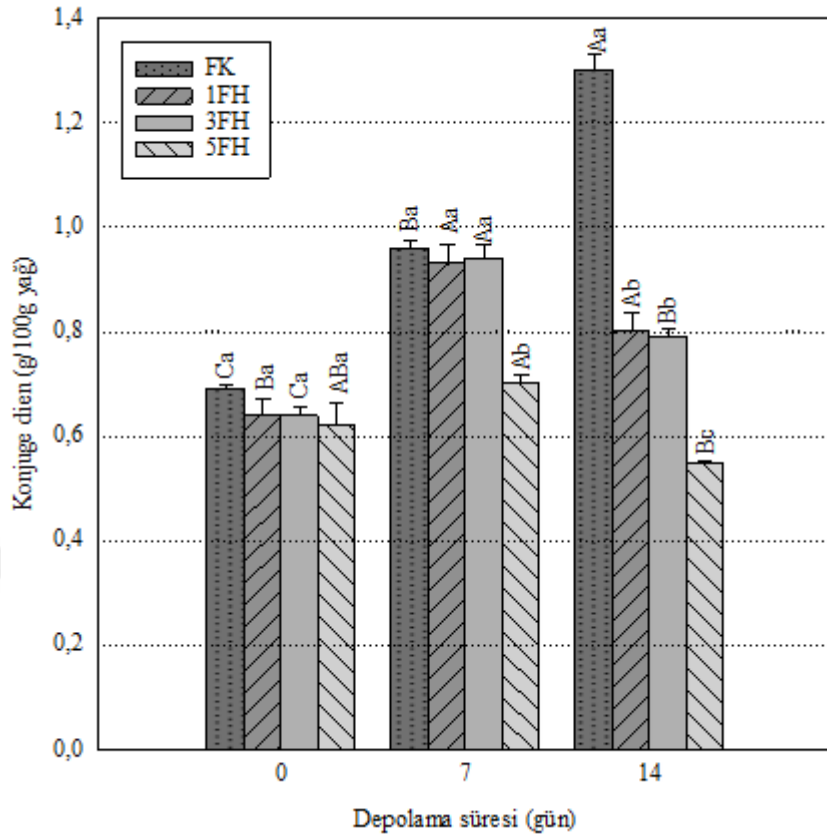
Emülsiyonlarda ve lipozomda, hidrolizat ilavesi ile depolama süresi arasında interaksiyon olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$). Tween-20 emülsiyonlarında, hidrolizat ilavesi tüm konsantrasyonlarda konjuge dien (KD) oluşumunu azaltmıştır (Şekil 4.6). İlave edilen hidrolizat konsantrasyonunun artması, 7. günde düşük KD içeriğine neden olsa da hidrolizat içeren örnekler arasında 14. günde önemli bir fark tespit edilmemiştir. 7. günde en yüksek KD miktarı FK'da (1.03 g/100 g yağ), en düşük KD miktarı ise 5FK'da (0.43 g/100 g yağ) belirlenmiştir. 7. günden sonra KD miktarındaki en fazla düşüş 1FK'da meydana gelmiştir (yaklaşık 0.45 birim). Depolama süresince kontrol örneklerinin KD miktarlarının artma eğiliminde olduğu görülmüştür. %5 hidrolizat ilavesi 7. günden itibaren antioksidan etki göstermiş ve KD miktarını en düşük seviyeye getirmiştir.



Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween-20 emülsiyonlarının depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim

TK, kontrol; 1TH, 3TH ve 5TH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren Tween 20 emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-d: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Konjuge dien miktarı kontrol grubunda depolama süresince artmış, 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 1FH'da en yüksek artış 7. günde gerçekleşmiş olup 14. günde değişmemiştir. 3FH ve 5FH'da ise en yüksek KD miktarları 7. günde belirlenmiştir. Lesitin emülsiyonlarında 7. ve 14. günlerde yüksek konsantrasyonda hidrolizat ilavesinin KD miktarını kontrol ile kıyaslandığında önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.7). Depolama sonunda elde edilen veriler, hidrolizatın düşük konsantrasyonlarda bile (1FH ve 3FH) KD oluşumunu azalttığını göstermiştir. Depolama süresinin sonunda en yüksek KD miktarı FK'de (1.30 g/100 g yağ), en düşük KD miktarı ise 5FH'de (0.55 g/100 g yağ) belirlenmiştir.

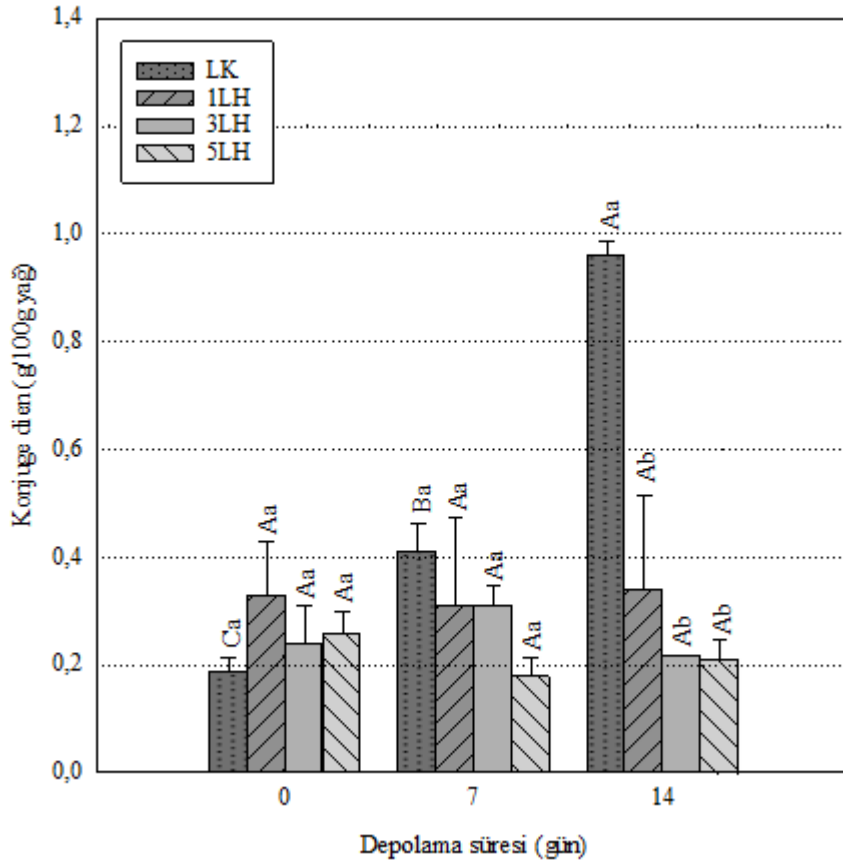


Şekil 4.7 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim

FK, kontrol; 1FH, 3FH ve 5FH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lesitin emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Farklı konsantrasyonlarda hidrolizat ilave edilen lipozom örneklerinin KD miktarlarında meydana gelen değişim şekil 4.8’de gösterilmiştir. Kontrol örneklerinin KD miktarları depolama süresince artmış, başlangıçta 0.19 g/100 g yağ iken depolama sonunda 0.96 g/100 g yağ olarak belirlenmiştir. Hidrolizat ilave edilen örneklerde ise konsantrasyona bakılmaksızın depolama süresine bağlı bir değişim gözlenmemiştir. KD değerleri depolama süresince 0.21-0.34 g/100 g yağ aralığında belirlenmiştir. Emülsiyon sistemlerinden farklı olarak, hidrolizat konsantrasyonunun konjuge dien miktarı üzerine etkisi önemsiz bulunmuş, yani tüm konsantrasyonlar benzer etki göstermiştir ($P > 0.05$).

Ancak, depolama sonunda hidrolizat içermeyen lipozomun hidrolizat içeren örneklerin yaklaşık üç katı konjuge dien içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişim

LK, kontrol; 1LH, 3LH ve 5LH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lipozomlar. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-b: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Genel olarak, tüm konsantrasyonlar lipit oksidasyonunu sınırlama kabiliyetine sahiptir. Ancak, yüksek hidrolizat konsantrasyonlarının daha iyi etki gösterdiği görülmüştür. Emülsiyonlarda, adsorbe olmayan proteinler, sulu fazda olduklarında pro-oksidanların bağlanması nedeniyle antioksidan olarak etki gösterme eğilimindedir (Hinderink vd. 2021). Dispersiyon sistemlerindeki lipit oksidasyonu üzerine yapılan çalışmalar, protein hidrolizatlarının ve peptitlerin, metal iyonlarını yakalayarak, radikalleri yok ederek, H

iyonları bağışlayarak ve peroksit öncüllerine reaksiyon göstererek antioksidan etkilerini gösterdiğini öne sürmektedir (Cheng vd. 2010, Zou vd. 2017). Çalışmamızda, hidrolizat konsantrasyonundaki artışının, depolama süresince salınan pro-oksidanların bağlanma hızını artırabileceği düşünülmektedir.

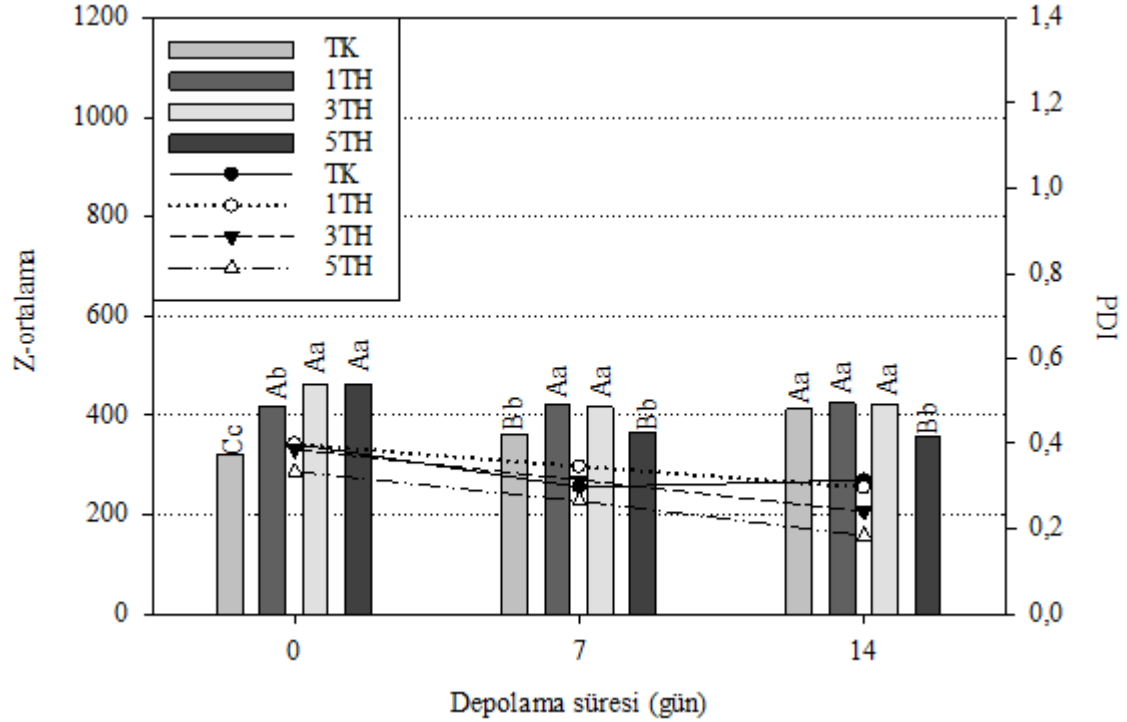
4.2.3 Partikül boyutu

Homojenizasyon sürecinde partiküllerin dağılması ve agregasyonu arasındaki denge, partikül boyutunu etkileyen temel faktördür. Proteinler ve peptitler, yağ/su arayüzünde bulunduklarında, yani emülsiyonlara sonradan değil de homojenizasyon aşamasında ilave edildiklerinde partikül boyutunu azaltma yeteneğine sahiptir (Liu vd. 2018). Bu çalışmada karaciğer hidrolizatının emülsiyonlara homojenizasyon işlemi sonrasında ve lipozoma süspansiyon şeklinde ilave edilmesi örneklerin başlangıç partikül boyutunu belirgin şekilde artırmıştır. Emülsiyonlarda ve lipozomda, hidrolizat ilavesi ile depolama süresi arasında interaksiyon olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$).

Depolama başlangıcında hidrolizat içermeyen Tween-20 emülsiyonlarının partikül boyutu 322.4 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Hidrolizat ilavesi partikül boyutunun artmasına sebep olmuş ve yüksek konsantrasyonda hidrolizat içeren emülsiyonların partikül boyutu 400 nm'nin üzerinde ölçülmüştür. 7. günde 1TH ve 3TH arasında bir farklılık görülmezken ($P>0.05$), 5TH'nin partikül boyutu başlangıç değerine kıyasla azalarak K ile aynı seviyeye gelmiştir. TK'nın partikül boyutu ise depolama süresince artış göstermiş, depolama sonunda 412.3 nm olarak ölçülmüştür. Depolama sonunda en düşük partikül boyutu 5TH'da belirlenmiş (358.4 nm), diğer gruplar ile K aynı seviyede kalmıştır.

Partikül boyutu gibi, polidispersite indeksi (PDI) de lipit dispersiyonlarının stabilitesi ile karakterizedir (Lei vd. 2019). Örneklerin başlangıç polidispersite indeksleri 0.33-0.39 aralığında belirlenmiştir. Partikül boyutunun aksine, PDI değerleri 0. günde yapılan hidrolizat ilavesinden etkilenmemiştir ($P>0.05$). Depolamanın 7. gününde başlangıç ile kıyaslandığında daha düşük PDI elde edilmiştir (0.27-0.34). Depolama sonunda hidrolizat

ilave edilen örneklerde PDI düşmeye devam etmiş, kontrol grubunda ise değişmemiştir. En düşük PDI, partikül boyutunda olduğu gibi 5TH'da ölçülmüştür (0.18).

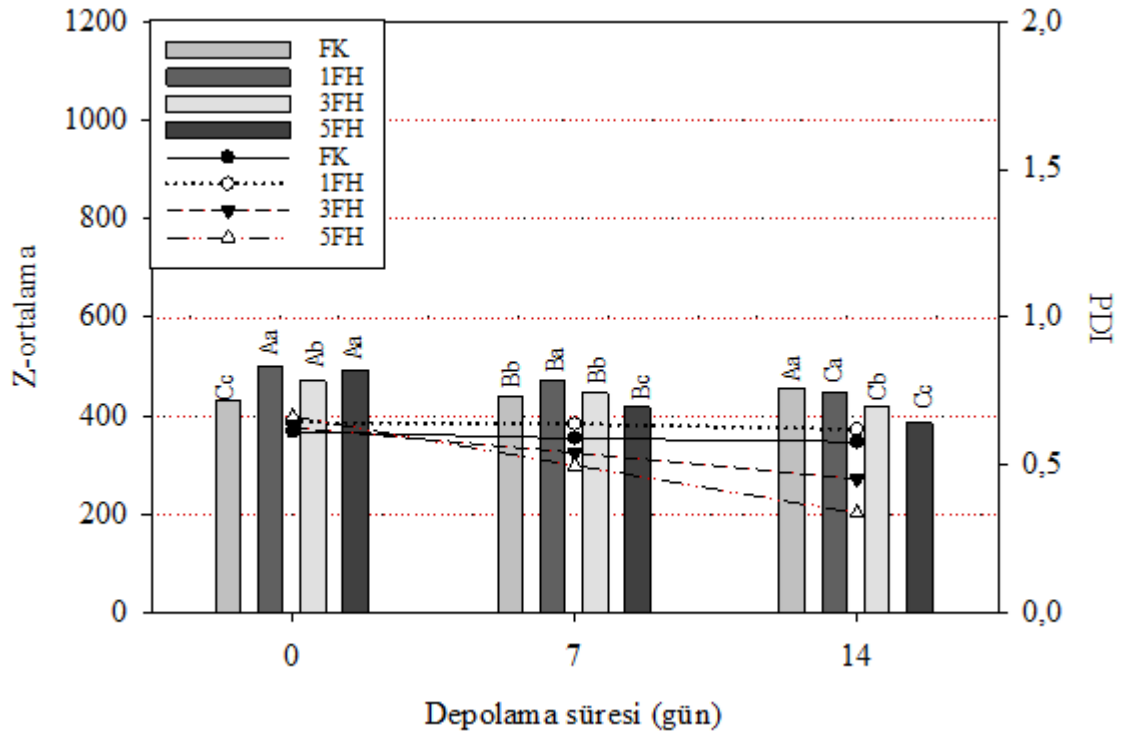


Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween-20 emülsiyonlarının depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafiği) meydana gelen değişim

TK, kontrol; 1TH, 3TH ve 5TH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren Tween-20 emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince partikül boyutu değerlerinde günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$).

Emülsiyon üretiminde %5 lesitin kullanılması Tween 20 emülsiyonları ile kıyaslandığında partikül boyutunun artmasına neden olmuştur. Örneklerin başlangıç Z-ortalama değerleri FK'da en düşük (432.2 nm) seviyededir (Şekil 4.10). Hidrolizat ilavesi konsantrasyondan etkilenmeksizin partikül boyutunu artırmıştır. Depolama süresince FK'nın partikül boyutu artmış, depolama sonunda 458.7 nm olarak ölçülmüştür. 7. günde 1FH en yüksek, 5FH ise en düşük partikül boyutuna sahip olmuştur. FK ve 3FH'nın partikül boyutları ise birbirlerine yakın değerlerdedir. Yüksek konsantrasyonlarda (%3 ve %5) hidrolizat ilave edilen emülsiyonların partikül boyutları depolama süresince azalmış, 14. günde en düşük seviyeye ulaşmıştır.

Lesitin ile hazırlanan emülsiyonlarda Tween-20 emülsiyonlarına göre daha yüksek PDI ölçülmüştür. 0. günde gruplar arası bir farklılık belirlenmemiştir ($P>0.05$). 7. ve 14. günlerde ise 5FK en düşük PDI'ne sahiptir (sırası ile 0.499 ve 0.338). K ve 1FH arasında bir fark görülmemiştir. Depolama süresince PDI değerleri ise 0.579-0.645 aralığındadır.



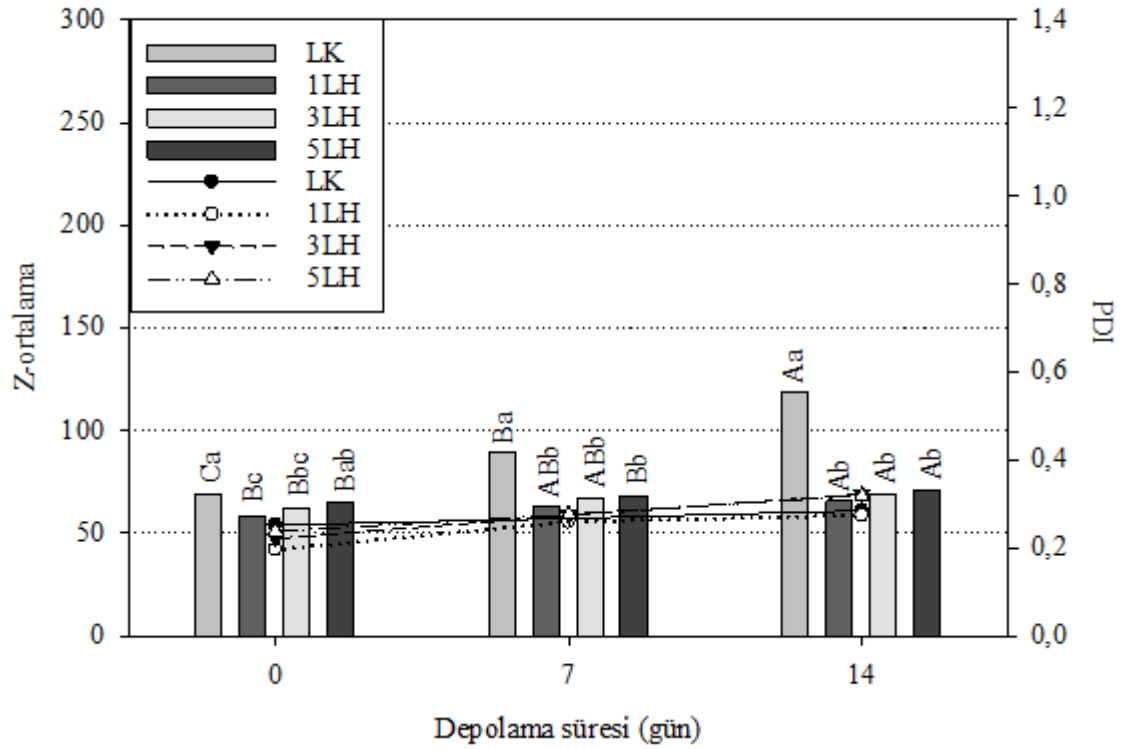
Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lesitin emülsiyonlarının depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafiği) meydana gelen değişim

FK, kontrol; 1FH, 3FH ve 5FH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lesitin emülsiyonları. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince partikül boyutu değerlerinde günler arası farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$).

Depolama sürecinde lipit oksidasyonu emülsiyon stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Sulu fazda protein ve hidrolizatların mevcudiyeti protein molekülünün üçüncül yapısına, yani yüzeye maruz kalan amino asitlerin antioksidan aktivitesine bağlı olarak lipit oksidasyonunu etkiler (Elias vd. 2008). Emülsifikasyon işleminin kendisi büyük bir enerji gerektirdiğinden bu işlem serbest radikal üretimini artırır. Çalışmamızda her iki emülsiyonda da hidrolizat ilave edilmeyen örneklerin partikül büyüklüğü depolama sırasında artmıştır. Sulu faza antioksidan olarak karaciğer hidrolizatı ilave edilmesi lipit

oksidasyonunu yavaşlatmıştır. Zhao vd. (2012) pirinç artıklarından üretilmiş hidrolizat ve Tween 20 kullanarak yağ/su emülsiyonları üretmiş ve lipit oksidasyonu üzerine etkisini 14 günlük depolama süresince araştırmışlardır. Hidrolizat-Tween 20 kullanılarak hazırlanan emülsiyonlarda kontrole kıyasla daha düşük seviyede lipit oksidasyonu belirlenmiştir. Ancak, K'de 3 gün, hidrolizat içeren emülsiyonlarda ise 10 günden sonra flokülasyon gözlemlendiğini ve fiziksel stabilitenin azaldığını ifade etmişlerdir. Günümüze kadar yapılmış çalışmalar protein yapıda emülsifiyerlerin diğer emülsifiyerlerle kıyaslandığında lipit partiküllerini oksidasyona karşı korumada daha başarılı olduğunu bildirmektedir. Ancak, bu çalışmaların çoğunda yüksek konsantrasyonlarda kullanılan protein yapıdaki emülsifiyerlerin, antioksidan etkilerini ara yüzeyde adsorbe olmayan ve sulu fazda yer alan kısmının faaliyeti sonucu gösterdikleri düşünülmektedir (Berton-Carabin vd. 2014).

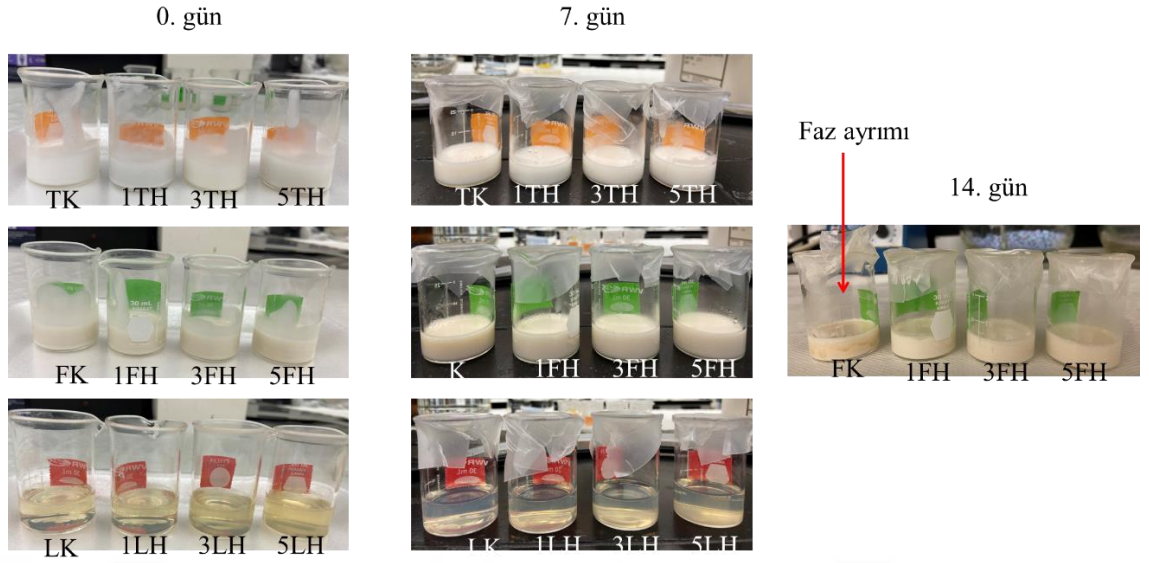
Şekil 4.11'de hidrolizat ilave edilen lipozomların partikül boyutunda ve polidispersite indeksinde meydana gelen değişim gösterilmiştir. Başlangıçta en düşük partikül boyutu %0.1 hidrolizat ilaveli lipozomda ölçülmüş, depolama sonuna kadar bu değer 58.74 nm'den 65.70 nm'ye yükselmiştir. Emülsiyonlarda olduğu gibi lipozomda da kontrol örneklerinin partikül boyutu depolama süresince artmıştır. Depolamanın 7. gününden itibaren ilave edilen hidrolizat konsantrasyonu partikül boyutunu etkilememiş, fakat bu örneklerin partikül boyutu K grubundan daha düşük seviyede kalmıştır ($P<0.05$). Polidispersite indeksinin hidrolizat ilavesi ve depolama sürecinden etkilenmediği görülmüştür ($P>0.05$).



Şekil 4.11 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren lipozomların depolama sırasında partikül boyutunda (Z-ortalama: ortalama partikül çapı, nm) ve polidispersite indeksinde (PDI) (çizgi grafiği) meydana gelen değişim

LK, kontrol; 1LH, 3LH ve 5LH, sırasıyla %0.1, 0.3 ve 0.5 hidrolizat içeren lipozomlar. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince partikül boyutu değerlerinde günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$).

Emülsiyonun lipit oksidasyonu ve fiziksel kararlılığı birbirine yakın ilişkili iki kavramdır. Oksidasyon ilerledikçe, lipit moleküllerinin arayüzdeki yönelimi değiştirilebilir, çünkü birçok oksidasyon ürünü konum ve yönelimlerini değiştirebilir. Pro-oksidanlar damlacık yüzeyine ulaştığında, lipit molekülleri ve pro-oksidanlar arasındaki etkileşimler sonucunda serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikaller, damlacık içindeki lipitlerle etkileşime geçebilir (McClements ve Decker 2000). Dolayısıyla, çift-fazlı sistemlerde antioksidan kullanarak serbest radikallerin oluşumunu sınırlandırmak, oksidatif koşullarda dahi fiziksel stabilite sağlayabilmektedir.



Şekil 4.12 Emülsiyon ve lipozomların depolama süresince görünüşleri

Lipit dispersiyon sistemlerinin hazırlanmasında yararlanılan emülsifiyerler fazla miktarda kullanıldığında antioksidan etki göstermektedir. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonda emülsifiyer kullanımı faz ayrımına sebep olan bir başka faktör olarak gösterilmektedir (Ye ve Singh 2007). Çalışmamızda lesitin emülsiyonlarının üretiminde yüksek konsantrasyonda lesitin kullanılmış olmasına rağmen, şekil 4.12’de görüldüğü üzere faz ayrımı sadece kontrol grubunda gözlenmiştir. Sonuç olarak, lesitin emülsiyonlarındaki düşük lipit oksidasyon seviyesi hidrolizat ilavesine atfedilebilir.

4.3 Biyoaktif Peptit İlavesinin Sucuğun Kalite Özelliklerine Etkisi

Sucuğa peptit fraksiyonu ilave edilen üçüncü aşama iki farklı amacı karşılamaya yöneliktir. Birincisi, sucukta mikrobiyal, duyuusal ve fiziksel kalite üzerine olumsuz bir etki olmaksızın lipit ve protein oksidasyonlarının önüne geçilmesi, üç aylık depolama süresince ürün özelliklerinin korunmasıdır. İkincisi ise, fermentasyon ile üretilen ve çok sayıda ingrediyeenin yer aldığı kompleks bir matrikse sahip et ürününe ilave edilen peptitlerin stabilitesinin belirlenmesidir.

4.3.1 Mikrobiyolojik

Karaciğer hidrolizatından farklı fraksiyonlarda (3 ve 10 kDa) izole edilen ve iki farklı konsantrasyonda (%0.5 ve %1) sucuk hamuruna ilave edilen peptitlerin sucuğun üretimi süresince mikrobiyal profiline etkisini gösteren sonuçlar çizelge 4.4'te verilmiştir. *Enterobacteriaceae* sayısı 0. günde 2.97-3.26 arasında değişmiştir. 6. ve 12. günlerde ise tüm gruplarda tespit edilebilir düzeyin altında (<1) belirlenmiştir. Bu durum, hammadde ve üretim koşullarının hijyenik kalitesini göstermekte olup, peptit ilavesinin *Enterobacteriaceae* sayısı üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Et ürünlerinde çeşitli bitkisel ekstraktlar, uçucu yağlar, organik asitler vb. patojen bakterilerin inhibisyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Fermente et ürünlerinde ise patojen bakteri inhibisyonu genellikle starter kültürler tarafından sağlanmaktadır. Starter kültür olarak tercih edilen bakteriler tarafından üretilen metabolitler ürün güvenliğine katkıda bulunur. Bakteriyosinler peptit yapısında bileşikler olup katyonik, amfibilik ve hidrofobik karaktere sahip olmaları nedeniyle özellikle Gram-negatif bakteriler üzerine etkilidir (Castellano vd. 2017). *Lactobacillus curvatus* tarafından üretilen üç farklı sakasin türünün *Enterobacteriaceae* gelişimini yavaşlattığı bildirilmiştir (Favaro ve Todorov 2017). Et ürünlerinde hijyenik kalitenin bir göstergesi olan *Enterobacteriaceae* sayısı, aynı zamanda üründe biyogenik amin oluşumunu teşvik eder. Yapılan araştırmalar starter kültür ilavesiyle ürünün güvenli hale getirildiğini göstermiştir. Sun vd. (2016), *L. plantarum* ve *S. xylosus* kültürleri fermente sosiste birlikte kullanıldığında 9. günde tam inhibisyon sağlandığını ve *Enterobacteriaceae* tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Bu etkinin starterli sosislerde su aktivitesi ve pH'da hızlı azalma ile ilişkili olduğunu veya bakterisidal etkiden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Tez çalışmasında 6. günden sonra sucukta *Enterobacteriaceae* tespit edilmemiş olması starter kültür kullanımına ek olarak etin başlangıçtaki hijyenik kalitesi ile ilişkili olabilir.

Çizelge 4.4 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesinin sucuklarda üretim süresince mikroorganizma sayıları üzerine etkisi (log kob/g)

Uygulama	Üretim süresi (gün)		
	0	6	12
<i>Enterobacteriaceae</i>			
K	3.26±0.22	<1	<1
3P1	3.26±0.22	<1	<1
3P2	3.13±0.54	<1	<1
10P1	2.97±0.49	<1	<1
10P2	3.03±0.61	<1	<1
Ortalama**	3.13±0.04 ^A	<1 ^B	<1 ^B
TAMB			
K	7.38±0.04	9.03±0.69	8.17±0.75
3P1	7.30±0.07	8.56±0.49	8.25±0.55
3P2	7.25±0.04	8.49±0.53	8.31±0.50
10P1	7.29±0.14	8.53±0.51	8.15±0.57
10P2	7.41±0.23	8.50±0.43	8.24±0.75
Ortalama**	7.33±0.32 ^B	8.62±0.14 ^A	8.23±0.16 ^A
KNK			
K	7.03±0.05	4.60±0.37	4.83±0.16
3P1	6.92±0.04	4.74±0.01	4.86±0.12
3P2	6.96±0.05	4.76±0.18	4.85±0.14
10P1	7.04±0.28	5.00±0.16	4.95±0.07
10P2	6.98±0.16	4.99±0.04	5.02±0.23
Ortalama**	7.03±0.06 ^A	4.82±0.06 ^B	4.93±0.04 ^B
LAB			
K	6.87±0.32	7.61±0.13	6.84±1.57
3P1	6.59±0.17	7.50±0.29	6.76±1.61
3P2	6.62±0.43	7.73±0.13	7.11±1.52
10P1	6.82±0.18	7.92±0.10	6.61±1.24
10P2	6.96±0.19	7.68±0.22	6.90±1.28
Ortalama	6.66±0.09	7.67±0.06	7.39±0.48
MAYA-KÜF			
K	2.52±0.88	2.93±0.65	3.02±1.17
3P1	2.63±0.79	3.11±0.29	<1
3P2	2.47±0.96	3.34±0.48	<1
10P1	2.39±0.85	2.80±0.68	2.56±0.90
10P2	2.59±0.59	3.02±0.70	2.25±1.58
Ortalama**	2.52±0.21 ^A	3.04±0.15 ^A	1.57±0.23 ^B

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, üretim süresince günler arası farklılıkları göstermektedir. **P<0.01.

Koagülaz negatif kok bakteri sayısı üretimin başlangıcında 6.92-7.04 log kob/g olarak belirlenmiştir. 6. günde bakteri sayısında azalma meydana gelmiş ve 4.60-5.00 log kob/g arasında değişmiştir. En düşük koagülaz negatif kok bakteri sayısı sırası ile K grubunda (4.60), 3P1 (4.74 log kob/g) ve 3P2 (4.74 log kob/g)'de belirlenmiştir. 10 kDa peptit fraksiyonlarını içeren sucuklarda ise daha yüksek sayıda bakteri (5.00 ve 4.99 log kob/g) tespit edilmiştir. Üretim sonunda K, 3P1 ve 3P2'de koagülaz negatif kok bakteri sayısı artmıştır. Buna karşın, 10P1 ve 10P2 gruplarına ait bakteri sayısında değişim meydana gelmemiştir. Koagülaz negatif koklar özellikle fermente et ürünlerinin karakteristik lezzetinin gelişiminde, nitrat redüktaz aktivitesi yoluyla kırmızı rengin oluşumu ve stabilizasyonunda, istenmeyen bakterilerin önlenmesinde ve oksidatif bozulmanın engellenmesinde önemli yere sahiptir (Cruxen vd. 2017). Yu vd. (2021) tarafından nisin ve ϵ -polylysine bakteriyosinlerinin kuru sosislerde koagülaz negatif kok bakteri sayısı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, depolamanın üçüncü gününde bakteri sayısının nisin ilaveli sosiste yaklaşık 1 log daha düşük olduğu belirlenmiştir. ϵ -polylysine ve kontrol örnekleri arasında ise depolama süresince fark olmadığı bildirilmiştir. 3. günde nisin ilaveli sosislerde ~4.5 log kob/g olan *Staphylococcus* sayısı depolama sonunda 6.0 log kob/g'a yükselmiştir. Kontrol ve ϵ -polylysine ilaveli sosislerde ise yaklaşık 0.5 birim daha düşük bakteri sayısı belirlenmiştir.

Üretimin başında 7.25-7.41 log kob/g aralığında belirlenen TAMB sayısı, 6. günde 8.49-9.03 log kob/g seviyelerine yükselmiş, üretim sonunda ise 8.15-8.31 log kob/g arasında değişmiştir. En yüksek TAMB sayısı 6. günde K grubunda (9.03 log kob/g) belirlenmiştir. Peptit ilave edilen sucuklarda TAMB sayısı K grubundan yaklaşık 0.5 log birim daha düşüktür. 12. günde TAMB sayısı, K grubunda 8.17 log kob/g ve 10P1'de 8.15 log kob/g olarak belirlenmiştir. Peptit ilavesinin TAMB sayısı üzerine etkisi olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Yu vd. (2021) ise nisin ve ϵ -polylysine ilavesiyle üretilen kuru sosislerde toplam bakteri sayısının 3. günde K'den daha düşük olduğunu, depolamanın daha sonraki günlerinde ise bu örneklerde daha yüksek bakteri sayısı belirlemişlerdir. Farklı starter kültürler kullanılarak üretilen sosislerde ise başlangıç bakteri sayısı starter içermeyen sosislerle kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur. Fermantasyonun ilerlemesiyle birlikte starter kültür ilavesinin toplam bakteri sayısını etkilemediği belirlenmiştir (Sun vd. 2016).

Sucuklarda belirlenen LAB sayıları 0. günde 6.59-6.96 log kob/g iken 6. günde fermentasyonun etkisi ile en yüksek seviyesine ulaşmıştır (7.50-7.92 log kob/g). Üretim sonunda tüm gruplarda azalma gözlenmiş, en yüksek LAB sayısı 3P2’de belirlenmiştir. %0.5 oranında peptit fraksiyonları içeren gruplarda LAB sayısı kontrolden daha düşük tespit edilmiştir. Ancak, sucuklara %1 oranında peptit ilavesi LAB gelişimini olumsuz etkilememiştir. LAB sayısı en düşük 10P1 grubunda (6.61 log kob/g), en yüksek 3P2 (7.11 log kob/g) grubunda tespit edilirken, K grubunda 6.84 log kob/g olarak belirlenmiştir. Fermente et ürünlerinin karakteristik özelliklerinin gelişimi ve ürün güvenliği açısından (pH’da hızlı azalma) biyoaktif özelliği nedeniyle ürüne ilave edilen peptitlerin laktik asit bakteri gelişimini inhibe edici etkiye sahip olmaması önemlidir. Yukarıda bahsedilen, nisin ve ϵ -polylysine ilavesiyle üretilen sosislerde 30 günlük depolama sonunda kontrole kıyasla daha yüksek LAB sayısı belirlenmiştir. Ancak, fermentasyonun ilk günlerinde nisin LAB sayısında önemli seviyede azalmaya neden olmuştur ($P < 0.05$). 3. günde K grubunda yaklaşık olarak 6.50 log kob/g, nisin ilaveli grupta ise 5.20 log kob/g bakteri sayılmıştır. Depolama sonunda ise tüm örneklerde ortalama 7.50 log kob/g LAB sayısı belirlenmiştir (Yu vd. 2021).

Maya-küf sayısı K grubunda üretimin başlangıcından itibaren artmış, peptit fraksiyonları içeren sucuklarda ise 6. günde artmış, 12. günde azalmıştır. 0. günde maya-küf sayısı 2.39-2.63 aralığında belirlenmiştir. En yüksek değerler 6. günde 3P2 ve 3P1’de belirlenmiştir. Buna karşın, 12. günde en düşük maya-küf sayısı yine bu gruplarda belirlenmiştir. Üretim sonunda K grubu 3.02 log kob/g maya-küf sayısına sahipken, 3P1 ve 3P2 tespit edilebilir düzeyin altında (< 1) maya-küf içermektedir. 10 kDa peptit fraksiyonları içeren gruplarda da K grubundan daha düşük değerler elde edilmiştir. Üretim süresince elde edilen değerler, 3 kDa molekül ağırlığında peptit fraksiyonlarının yüksek antifungal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 10 kDa molekül ağırlığında peptitlerin de antifungal etkisi söz konusudur. Günümüze kadar yapılan hiçbir çalışmada fermente bir et ürününün üretimi süresince peptit veya bakteriyosin ilavesinin üründe maya ve küf gelişimi üzerine etkisinden bahsedilmemektedir. Ancak, çeşitli et ve et ürünlerine peptit veya hidrolizat ilavesinin fungal gelişimi depolama süresince yavaşlattığı bildirilmiştir (Bougatef vd. 2018, Verma vd. 2022, Yekta vd. 2020). Bununla birlikte, peptitlerin antifungal etkisinin in vitro olarak araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma

mevcuttur. El-Saadony vd. (2021), kırmızı fasulye ve bezelyeden ürettikleri peptitlerin *Alternaria alternata* inhibisyonu için gerekli minimum konsantrasyonunun 55-80 µg/ml olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada, "Phaseolus mungo" (Mung fasulyesi) tohumlarından izole edilen 10 kDa molekül ağırlığına sahip peptitlerin *Physalospora piricola*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Botrytis cinerea*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* türlerine karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir (Wang vd. 2006). Cournoyer vd. (2022), domuz kanının büyük ölçüde hemoglobinden oluşan katı kısmından elde ettikleri hidrolizatların *S. boulardii*, *C. guilliermondii*, *K. marxianus*, *M. racemosus* and *P. chrysogenum* üzerinde antifungal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.5, farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonları içeren ve içermeyen gruplarda 3 aylık depolama süresince belirlenen mikroorganizma sayılarını göstermektedir. Depolamanın başlangıcından itibaren tüm gruplarda *Enterobacteriaceae* sayısı <1 olarak belirlenmiştir.

Koagülaz negatif kok bakteri sayısı depolama başlangıcında (12.gün) 4.83-5.01 log kob/g arasında değişmektedir. Tüm gruplarda en düşük bakteri sayısı 72. günde belirlenmiştir. Depolama süresince gruplar arasında önemli bir farklılık görülmemektedir. Ancak 102. günde 10P2, diğer gruplardan daha yüksek koagülaz negatif kok bakteri sayısına sahip olmuştur (4.77 log kob/g) (P<0.05).

Sucukların TAMB sayısı, 2. ayda depolama başlangıcına göre bir miktar azalma göstermiş, depolama sonunda ise en düşük seviyeye ulaşmıştır (P<0.01). Depolama başlangıcında 8.23 olarak belirlenen bakteri sayısı depolama sonunda yaklaşık olarak 1 logaritmik düzeyde azalarak 7.31 olarak belirlenmiştir. Sucuklara peptit ilavesinin TAMB sayısını etkilemediği görülmüştür.

Çizelge 4.5 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesinin sucuklarda depolama süresince mikroorganizma sayıları üzerine etkisi (log kob/g)

Uygulama	Depolama süresi (ay)			
	0	1	2	3
K	<1	<1	<1	<1
3P1	<1	<1	<1	<1
3P2	<1	<1	<1	<1
10P1	<1	<1	<1	<1
10P2	<1	<1	<1	<1
Ortalama				
TAMB				
K	8.17±0.75	8.30±0.58	7.51±0.47	7.21±0.89
3P1	8.25±0.55	7.88±0.46	7.41±0.76	7.14±0.93
3P2	8.31±0.50	8.33±0.28	7.82±0.43	7.41±0.79
10P1	8.15±0.57	8.31±0.31	7.86±0.56	7.29±0.74
10P2	8.24±0.75	8.19±0.46	7.97±0.46	7.52±0.52
Ortalama**	8.23±0.73 ^A	8.20±0.42 ^{AB}	7.72±0.54 ^B	7.31±0.78 ^C
KNK				
K	4.83±0.16	4.90±0.19	4.31±0.68	4.58±0.62
3P1	4.86±0.12	4.85±0.04	4.35±0.52	4.57±0.58
3P2	4.85±0.14	4.86±0.11	4.35±0.66	4.54±0.88
10P1	4.95±0.07	5.13±0.35	4.35±0.48	4.57±0.86
10P2	5.02±0.23	4.99±0.20	4.34±0.48	4.77±0.76
Ortalama*	4.90±0.04 ^A	4.95±0.05 ^A	4.34±0.14 ^B	4.61±0.19 ^{AB}
LAB				
K	6.84±1.57	7.12±1.47	6.86±0.42	6.98±1.14
3P1	6.76±1.61	7.21±1.22	7.62±1.16	6.98±0.86
3P2	7.11±1.52	7.02±1.72	7.60±0.85	7.38±0.67
10P1	6.61±1.24	7.22±1.44	7.17±0.24	7.60±0.86
10P2	6.90±1.28	7.28±1.44	7.51±0.52	7.42±0.53
Ortalama	6.84±0.14 ^B	7.17±0.18 ^{AB}	7.35±0.56 ^A	7.27±0.74 ^{AB}
MAYA-KÜF				
K	3.02±1.17 ^a	<1	<1	<1
3P1	<1 ^c	<1	<1	<1
3P2	<1 ^c	<1	<1	<1
10P1	2.56±0.90 ^b	<1	<1	<1
10P2	2.25±1.58 ^b	<1	<1	<1
Ortalama*	1.57±0.23 ^A	<1 ^B	<1 ^B	<1 ^B

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli
A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları göstermektedir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Depolama başlangıcında LAB sayısı en yüksek 3P2 grubunda belirlenmiştir (7.11 log kob/g). LAB sayısında, 2. aydan sonra peptit ilaveli gruplarda artma, K grubunda ise azalma gözlenmiştir. 3. ayda peptit içeren grupların LAB sayıları 7.51-7.62 log kob/g

iken, K grubunda 6.86 log kob/g'dır. 102. günde K grubunda LAB sayısı bir miktar artmış, diğer gruplarda ise azalmıştır. Buna rağmen depolama sonunda en yüksek bakteri sayısı yüksek oranda peptit içeren gruplarda (3P2 ve 10P2) belirlenmiştir.

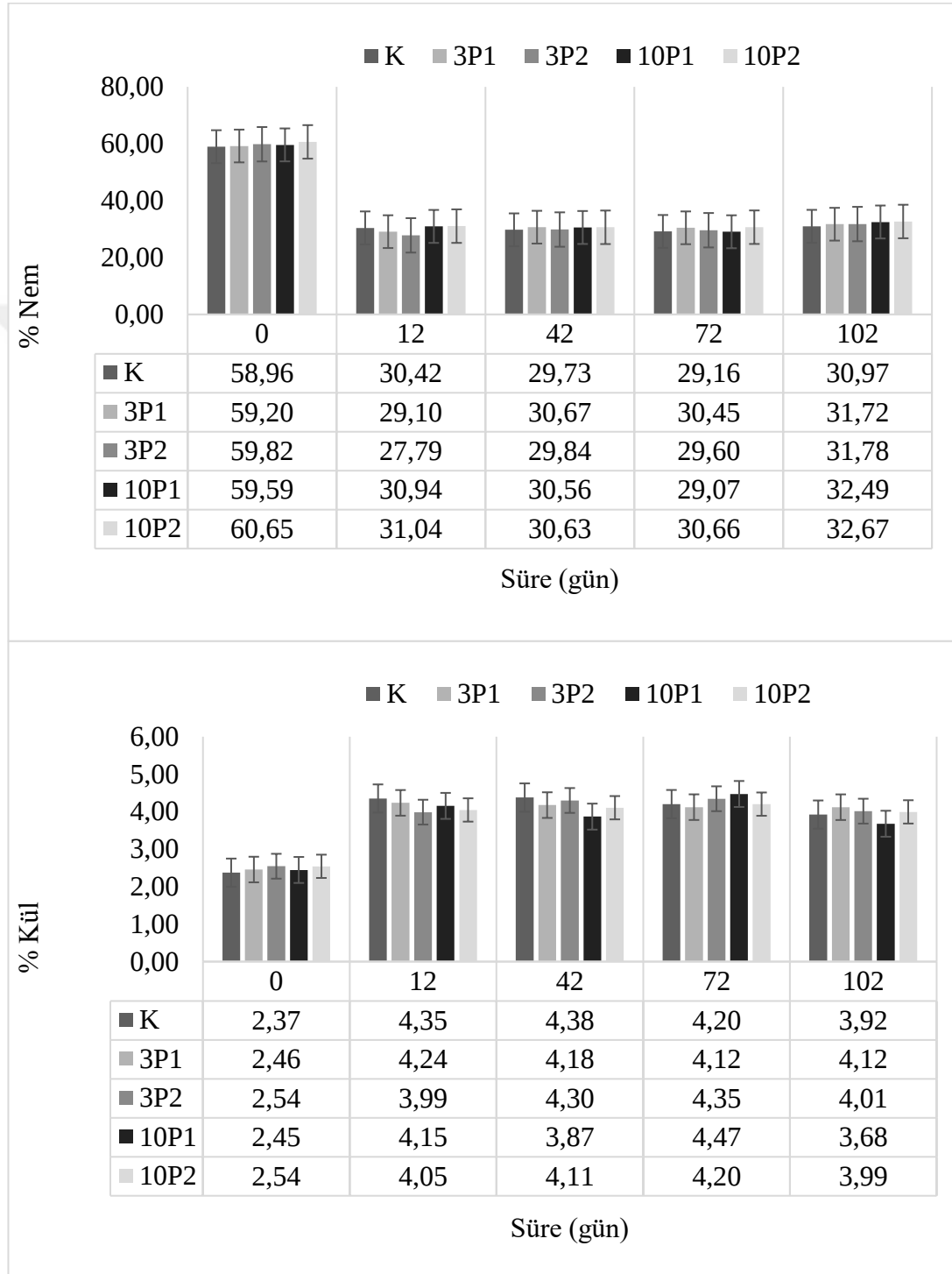
3P1 ve 3P2 gruplarına ait maya-küf sayıları depolama başlangıcında <1 olarak belirlenmiş ve depolama süresince değişmemiştir. Başlangıçta en yüksek maya-küf sayısı K örneklerinde belirlenmiştir (3.02 ± 1.17 log kob/g). K grubundan daha düşük maya-küf belirlenmiş olması 10 kDa MA'lı peptitlerin antifungal aktiviteye sahip olduğunu, ancak bu aktivitenin 3 kDa MA'lı peptitlerden daha düşük olduğunu göstermiştir. K, 10P1 ve 10P2'de maya-küf sayıları, ancak 2. aydan itibaren <1 seviyesine inmiştir ($P < 0.05$).

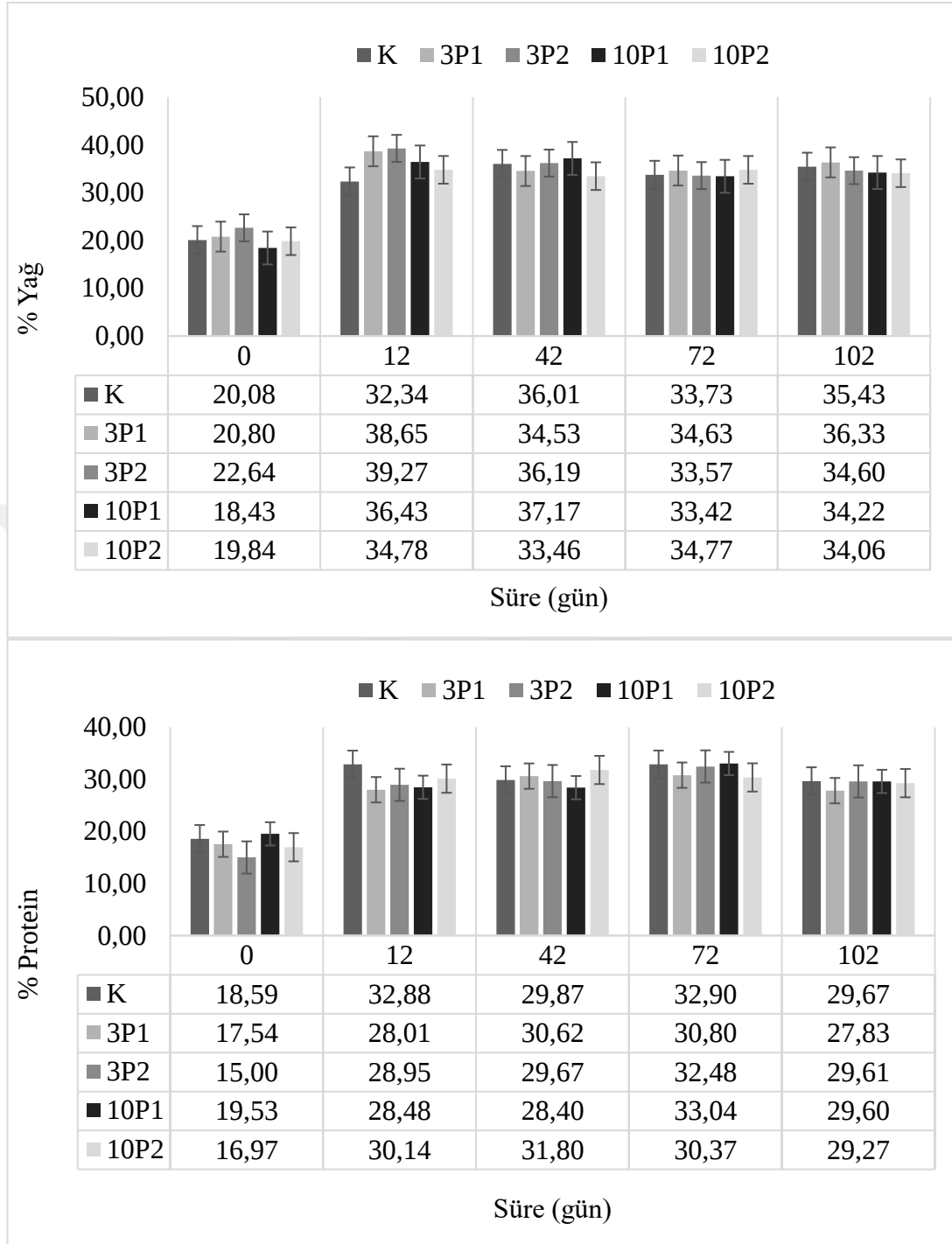
Literatürde peptit ilavesinin et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesine etkisini inceleyen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Fermente et ürününe ilavesi ise daha önce çalışılmamıştır. Sığır hemoglobininin enzimatik hidroliz yoluyla üretilen antimikrobiyal niteliği kanıtlanmış bir peptidin ($\alpha 137-141$) sığır köftesine %0.1 ve 0.5 oranlarında ilave edildiği çalışmada 4°C'de 14 gün muhafaza süresince TMAB, LAB ve maya-küf sayıları araştırılmıştır. TMAB yükünün peptit ilavesiyle kontrol grubu ile kıyaslandığında azaldığını bildirmişlerdir. Maya ve küf sayısının 9. güne kadar peptit ilavesinden etkilenmediğini, sadece 7. günde %0.5 peptit ilavesi ile azaldığını belirlemişlerdir. LAB sayısının ise 14. günde K'den daha düşük seviyede olduğunu rapor etmişlerdir (Przybylski vd. 2016).

4.3.2 Kimyasal bileşim

Farklı molekül ağırlığı ve konsantrasyonlarda peptit ilavesi yapılan sucukların % nem, kül, yağ ve protein miktarları şekil 4.13'te verilmiştir. Üretimin başında %59 düzeyinde nem içeren örneklerin nem miktarları üretim sonunda %27-31 aralığında belirlenmiştir. Depolama süresince nem içeriklerinde belirgin bir değişim meydana gelmemiş, ancak depolama sonunda 10 kDa peptit içeren gruplar 3 kDa peptit içeren gruplardan %1, kontrol grubundan ise %2 oranında daha yüksek nem içeriğine sahip olmuştur. Bu örneklerin yüksek nem içerikleri peptitlerin su tutma kapasitesi ile ilişkilendirilebilir. Denizatı ve kanola proteinlerinden elde edilen hidrolizatların et ürünlerinde su tutma

kapasitesini artırdığı bildirilmiştir (Cumby vd. 2008, Karami ve Akbari-adergani 2019). Sucukların başlangıç kül miktarları %2.37-2.54 aralığında iken üretim sonunda %3.99-4.35 ve depolama sonunda %3.69-4.12 olarak belirlenmiştir.





Şekil 4.13 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların bileşim analizi sonuçları

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

Yağ miktarları üretimin başında 10P1 ve 10P2’de diğer gruplardan daha düşük bulunmuştur. Üretim sonunda 3 kDa peptit ilavesi yapılmış sucukların yağ içerikleri

kontrol grubu ile kıyaslandığında %7 daha yüksektir. Depolama süresince sucukların yağ miktarında önemli bir değişim meydana gelmemiş ve ortalama %30 düzeyinde seyretmiştir. Sucukların % protein içerikleri 0.günde %15.00-19.53 olarak belirlenmiş, üretim sonunda (12.gün) kurumaya bağlı olarak artarak %28.01-32.88 olmuştur. Kontrol grubunda % protein miktarı depolama başlangıcından itibaren azalmış ve depolama sonunda %3 daha düşük olarak belirlenmiştir.

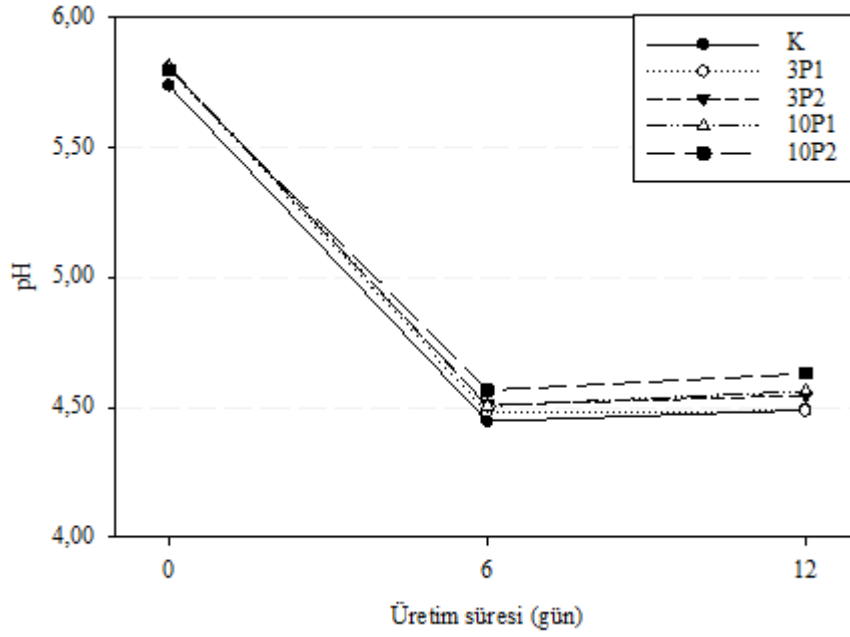
4.3.3 pH

Farklı konsantrasyonlarda peptit ilave edilen sucukların pH değerlerinde üretim sırasında meydana gelen değişimler şekil 4.14'te gösterilmektedir. İstatistik analiz sonucunda peptit ilavesi ve süre faktörleri arasında interaksiyon olmadığı ($P>0.05$), ancak her iki faktörün de ayrı ayrı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Üretim başlangıcında 5.79 olarak ölçülen pH değeri 6. günde 4.50, üretim sonunda ise 4.54 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Süreden bağımsız olarak örnekler arasında en düşük pH K grubunda belirlenmiştir. 3P2, 10P1 ve 10P2'nin pH değerleri K'den daha yüksektir. Protein degradasyonu sonucu meydana gelen serbest amino asitler pH'yı artırma etkisine sahiptir (Rawdkuen vd. 2013). Dolayısıyla, üretim sırasında pH değerleri arasında görülen bu farklılık, ilave edilen peptit fraksiyonlarının amino asit içeriği ile ilişkili olabilir.

Çizelge 4.6 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda üretim sırasında pH değerleri

Uygulama	Üretim süresi (gün)			
	0	6	12	
K	5.74±0.03	4.45±0.09	4.49±0.04	4.89±0.04 ^a
3P1	5.80±0.05	4.48±0.02	4.49±0.08	4.92±0.05 ^{ab}
3P2	5.80±0.02	4.51±0.04	4.55±0.06	4.95±0.04 ^{bc}
10P1	5.81±0.02	4.51±0.01	4.56±0.08	4.96±0.04 ^{bc}
10P2	5.80±0.07	4.57±0.03	4.63±0.03	5.00±0.04 ^c
	5.79±0.04 ^A	4.50±0.04 ^C	4.54±0.06 ^B	

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları ($P<0.05$); a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.14 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda pH değerinde üretim süresince meydana gelen değişim

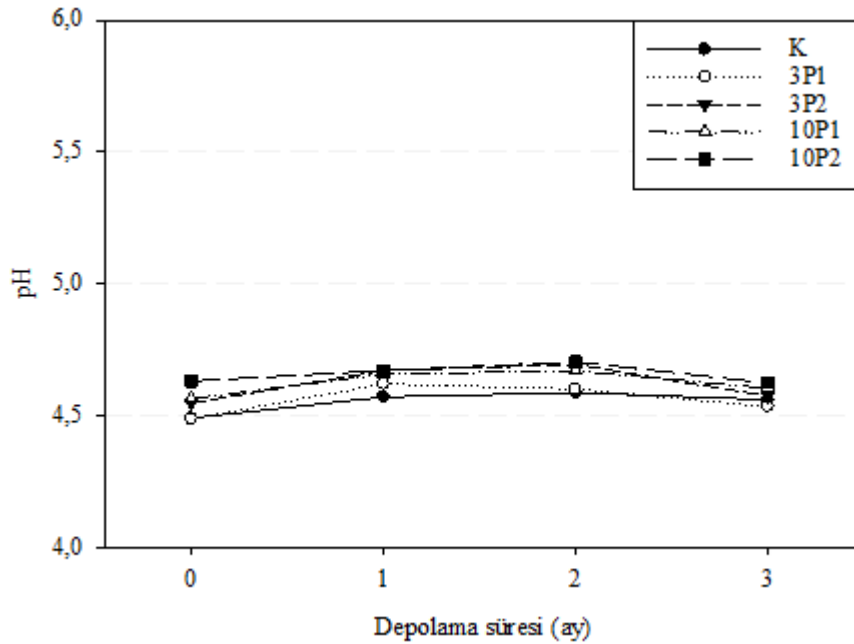
Depolama süresince sucukların pH değerlerinde meydana gelen değişim çizelge 4.7’de ve şekil 4.15’te görülmektedir. Peptit ilavesi ve süre faktörleri arasında istatistiksel olarak interaksiyon belirlenmemiş olup, yalnızca depolama süresi pH değerlerini etkilemiştir ($pH < 0.05$). Depolamanın 1. ve 2. aylarında başlangıca göre pH’da artma (4.64 ± 0.08), depolama sonunda ise azalma tespit edilmiştir (4.58 ± 0.04). Depolama sırasında meydana gelen pH artışı bu defa peptit ilavesi ile değil, et proteinlerinin degradasyonu sonucu serbest amino asit miktarının artması ile ilişkilendirilebilir.

Çizelge 4.7 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda depolama sırasında pH değerleri

Uygulama	Depolama süresi (ay)			
	0	1	2	3
K	4.49±0.04	4.57±0.06	4.59±0.06	4.56±0.05
3P1	4.49±0.08	4.62±0.14	4.60±0.06	4.53±0.07
3P2	4.55±0.06	4.67±0.17	4.69±0.04	4.57±0.08
10P1	4.56±0.08	4.66±0.12	4.67±0.01	4.60±0.08
10P2	4.63±0.03	4.67±0.08	4.70±0.03	4.62±0.03
Ortalama	4.54±0.06 ^C	4.64±0.11 ^{AB}	4.65±0.04 ^A	4.58±0.06 ^B

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları ($P < 0.05$) göstermektedir.

Biyoaktif peptit ilave edilecek gıdanın pH'sı biyoaktif niteliğin korunması bakımından önem arz eder. Çünkü pH, peptit bileşiklerinin net yükünü, gıda matrisi içinde gerçekleşen moleküler etkileşimleri ve yapısını etkiler. Frankfurterlere farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu hidrolizatı ilavesinin pH üzerinde etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Barrón-Ayala vd. 2020). Bufalo etinin farklı konsantrasyonlarda kırmızı fasulye hidrolizatına daldırıldığı bir başka çalışmada ise 15 günlük depolama süresince pH'da artış meydana geldiği, ancak yüksek konsantrasyonda hidrolizat ile muamele işleminin bu artışı sınırladığı bildirilmiştir. Hidrolizat ilavesinin pH üzerindeki bu etkisi mikrobiyal gelişmenin sınırlandırılması ile ilişkilendirilmiştir (El-Saadony vd 2021). Tez çalışmasında ise literatür verileri ile kıyaslandığında depolama süresinin etkisi için benzer sonuçlar söz konusudur. Ancak üretimde peptit ilavesiyle pH da az da olsa bir artış söz konusudur. Bu farklılık, protein hidrolizatları ile kıyaslandığında peptit fraksiyonlarının serbest amino asit miktarının oransal olarak daha yüksek olması ve peptit ilave edilen örneğin literatürde yer alan ürünlerden farklı olması (üretim süresi, fermantasyon ve starter kültür kullanımı) nedenleri ile açıklanabilir.



Şekil 4.15 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda pH değerinde depolama süresince meydana gelen değişim

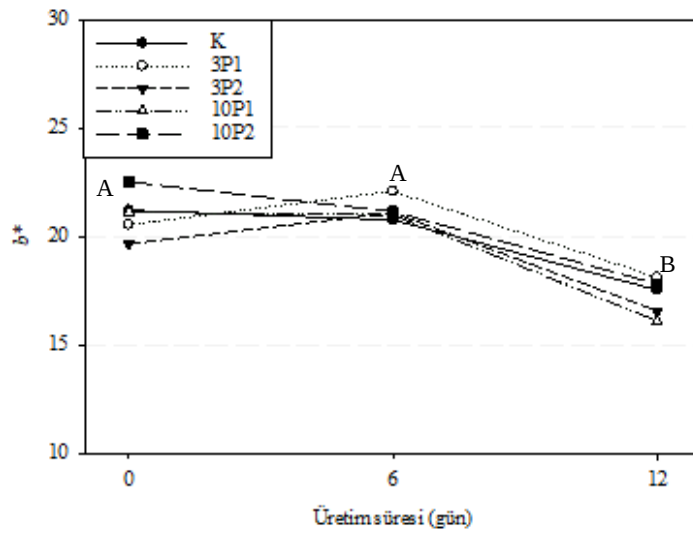
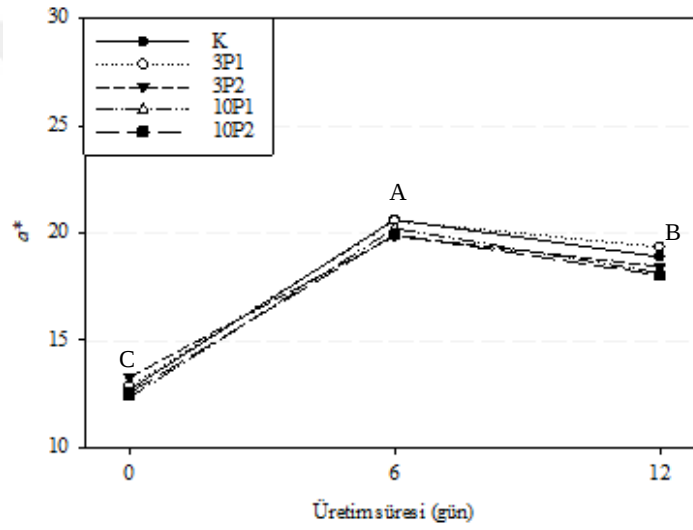
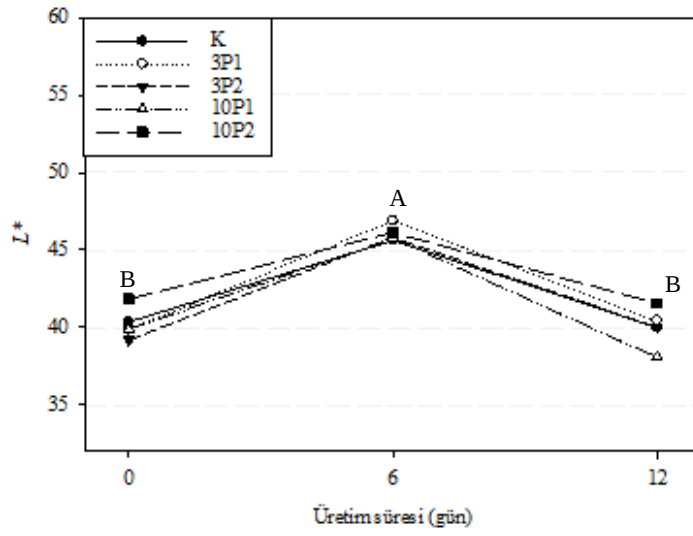
4.3.4 Renk ölçümü

Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesi ile üretilen sucukların CIE L^* (aydınlık), a^* (kırmızılık) ve b^* (sarılık) renk değerlerinde üretim süresince meydana gelen değişim çizelge 4.8’de ve şekil 4.16’da gösterilmektedir. Sucuk örneklerinin renk değerleri peptit ilavesinden etkilenmemiştir ($P>0.05$). Ancak, üretim ve depolama sürelerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Aydınlık (L^*) değerleri 6. günde artmış, 12. günde ise azalmıştır. Kırmızılık (a^*) değerleri 0. günde 12.35-13.29 aralığında iken, 6. günde 19.87-20.63 arasında ölçülmüştür. En yüksek a^* değerleri 6. günde ölçülmüştür. Üretim sonunda a^* değerlerinde azalma meydana gelmesine rağmen başlangıç değerinin üzerinde kalmıştır. Sarılık (b^*) değerleri 0. ve 6. günlerde birbirine yakın ölçülmüştür. 6. günden sonra ise tüm gruplarda belirgin şekilde azalmıştır.

Çizelge 4.8 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda üretim sırasında CIE* renk değerleri

Uygulama	Üretim süresi (gün)		
	0	6	12
L^*			
K	40.37±0.91	45.63±1.17	40.02±0.99
3P1	39.88±0.89	46.89±0.49	40.46±1.96
3P2	39.21±1.35	45.81±0.89	40.04±1.23
10P1	39.91±0.77	45.77±0.99	38.09±1.25
10P2	41.85±1.28	46.14±1.18	41.57±0.39
Ortalama	40.24±1.04 ^B	46.05±0.94 ^A	40.04±1.16 ^B
a^*			
K	12.71±0.08	20.63±1.04	18.89±0.57
3P1	12.86±0.52	20.58±1.22	19.35±1.92
3P2	13.29±1.25	19.87±0.68	18.45±0.74
10P1	12.35±0.87	20.22±0.91	18.15±0.40
10P2	12.56±0.64	19.93±0.24	18.04±0.59
Ortalama	12.75±0.67 ^C	20.25±0.82 ^A	18.58±0.84 ^B
b^*			
K	21.20±1.38	20.76±1.60	17.52±1.07
3P1	20.54±0.32	22.08±1.09	18.11±2.25
3P2	19.65±1.69	21.09±0.78	16.55±0.56
10P1	21.11±0.66	20.99±1.75	16.09±0.80
10P2	22.51±0.49	21.14±0.49	17.81±0.51
Ortalama	21.00±0.91 ^A	21.21±1.14 ^A	17.22±1.04 ^B

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$).



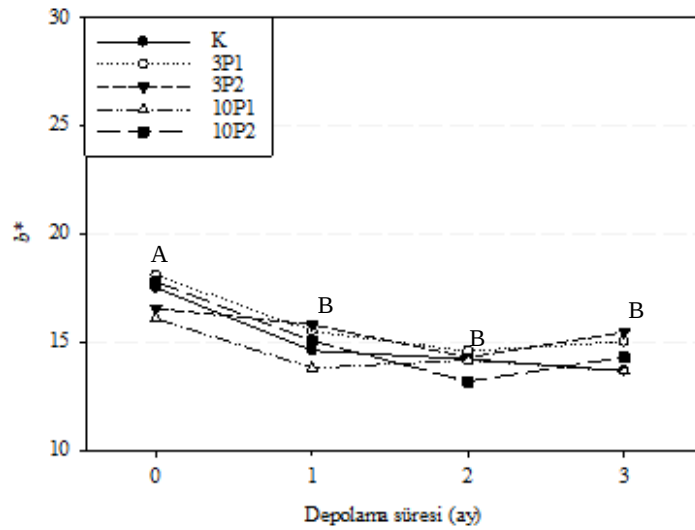
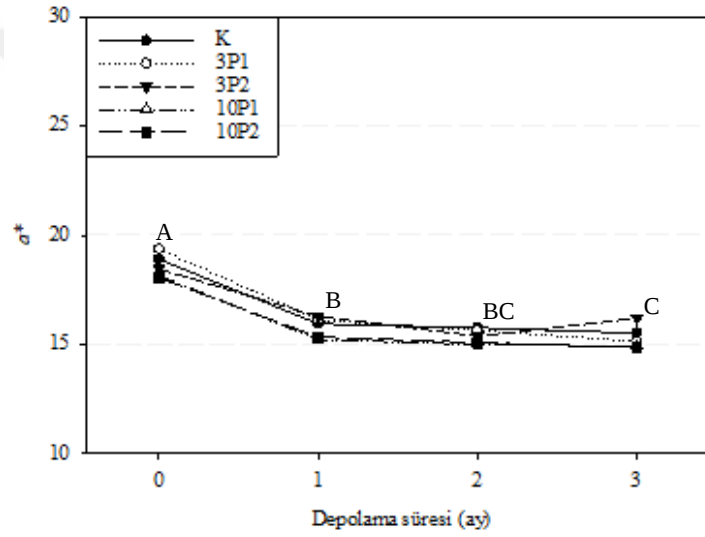
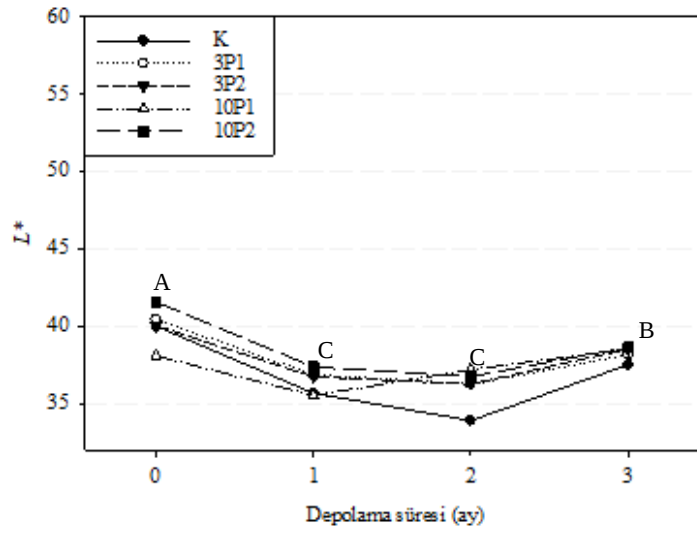
Şekil 4.16 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların CIE* renk değerlerinde üretim süresince meydana gelen değişim

Depolama sırasında en yüksek CIE* renk değerleri depolama başlangıcında ölçülmüştür (Şekil 4.17). L^* değerleri 1. ve 2. aylarda en düşük seviyede belirlenmiş, 3. ayda ise 2 birimlik artış göstererek 38.28 ± 0.17 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.9). Depolama başlangıcında 18.58 ± 0.04 olan a^* değerleri 1. aydan itibaren azalmış, depolama sonunda yaklaşık 3 birim azalarak en düşük seviyeye ulaşmıştır. ikinci aydan sonra önemli bir değişiklik olmamıştır. Örneklerin b^* değerleri 1. ayda önemli düzeyde (yaklaşık 2.5 birim) azalmış ($P < 0.01$), 1. aydan sonra değişmemiştir. Üretim ve depolama süresince yapılan ölçümler peptit ilavesinin sucuk rengini olumsuz etkilemediğini göstermiştir.

Çizelge 4.9 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda depolama sırasında CIE* renk değerleri

Uygulama	Depolama süresi (ay)			
	0	1	2	3
L^*				
K	40.02 ± 0.99	35.68 ± 2.40	33.90 ± 2.27	37.52 ± 2.13
3P1	40.46 ± 1.96	36.86 ± 2.44	36.27 ± 1.55	38.19 ± 1.78
3P2	40.04 ± 1.23	36.73 ± 1.36	36.26 ± 1.26	38.52 ± 0.82
10P1	38.09 ± 1.25	35.51 ± 1.49	37.20 ± 1.31	38.52 ± 0.93
10P2	41.57 ± 0.39	37.37 ± 1.24	36.74 ± 0.51	38.65 ± 0.30
Ortalama	40.04 ± 1.18^A	36.43 ± 1.79^C	36.07 ± 1.39^C	38.28 ± 1.20^B
a^*				
K	18.89 ± 0.57	15.94 ± 0.34	15.76 ± 1.44	15.51 ± 0.35
3P1	19.35 ± 1.92	16.12 ± 0.82	15.63 ± 2.19	15.14 ± 1.43
3P2	18.45 ± 0.74	16.27 ± 0.50	15.37 ± 0.40	16.18 ± 0.39
10P1	18.15 ± 0.40	15.21 ± 0.40	14.98 ± 0.30	14.91 ± 0.46
10P2	18.04 ± 0.59	15.32 ± 0.52	15.08 ± 0.25	14.84 ± 0.36
Ortalama	18.58 ± 0.84^A	15.77 ± 0.52^B	15.36 ± 0.92^{BC}	15.31 ± 0.60^C
b^*				
K	17.52 ± 1.07	14.60 ± 0.52	14.22 ± 0.09	13.66 ± 1.20
3P1	18.11 ± 2.25	15.50 ± 0.75	14.59 ± 0.06	15.02 ± 0.75
3P2	16.55 ± 0.56	15.81 ± 0.79	14.29 ± 0.03	15.45 ± 0.90
10P1	16.09 ± 0.80	13.80 ± 0.47	14.17 ± 1.44	13.65 ± 1.16
10P2	17.81 ± 0.51	15.05 ± 0.76	13.18 ± 0.61	14.30 ± 0.75
Ortalama	17.22 ± 1.04^A	14.95 ± 0.66^B	14.09 ± 1.19^B	14.42 ± 0.95^B

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$).



Şekil 4.17 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucukların CIE* renk değerlerinde üretim süresince meydana gelen değişim

Kürlenmiş et ürünlerinin rengi myoglobin, oksimiyoglobin, metmiyoglobin ve nitrozomiyoglobin içeriği ile ilişkilidir. Kuru fermente soslerde ise renk, et pigmentleri ile eklenen nitrat ve nitritlerin indirgenmesinden kaynaklanan ürünler arasındaki etkileşimlerden kaynaklanır. İşleme koşulları, yağ miktarı ve bazı katkı maddeleri fermente et ürünlerinin renk stabilitesini etkiler (Soyer and Ertaş, 2007). Yağ miktarı genellikle ürünün aydınlık ve kırmızılık değerlerini etkilerken, sarılık değeri çoğunlukla ürün bileşimine ilave edilen çeşitli baharatlardan kaynaklanır. Lipit ve protein oksidasyonları ise et rengini olumsuz etkiler. Depolama ve kurutma gibi süreçler ürünün nem kaybetmesine ve rengin değişmesine neden olur (Tomovic vd. 2020, Ribeiro vd. 2021). Dolum yapılan kılıf materyali, geçirgenliğine bağlı olarak ürün rengini etkileyen bir başka faktör olarak bilinmektedir. Kolajen kılıflar doğal kılıflara göre daha zayıf geçirgenliğe sahip olduklarından, oksijenin miyoglobinle reaksiyona girme eğilimi daha azdır. Ancak, bu özellikleri aynı zamanda lipit ve protein oksidasyonu için ortamda daha az oksijen bulunmasını sağlar (Yan vd. 2022). Fermente et ürünlerine antioksidan ilavesinin ise et rengini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (Descalzo ve Sancho 2008).

Verma vd. (2022), domuz kanı ve karaciğerinden elde ettikleri hidrolizatları 600 mg/g konsantrasyonda domuz somununa ilave etmişlerdir. Aerobik ve modifiye atmosferde ambalajladıkları örnekleri 4°C’de 42 gün depolamış ve depolama süresince renk ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Ölçümler sonucunda hidrolizat ilave edilen örneklerin L^* değerlerinin azaldığını, ancak depolama süresinin ilerlemesiyle önemli düzeyde arttığını belirlemişlerdir. a^* ve b^* değerlerinin hidrolizat içeren örneklerde K’den daha yüksek olduğunu, ancak depolama sonunda örneklerin daha düşük a^* ve b^* değerleri ölçüldüğünü bildirmişlerdir. MAP koşullarında depolanan örneklerin renginde daha az değişim meydana geldiğini belirtmişlerdir. Et emülsiyonlarına patates protein hidrolizatının ilave edildiği bir başka çalışmada ise, K ile kıyaslandığında, L^* , a^* ve b^* değerlerinin sırasıyla %5, %41 ve %15 oranlarında azaldığı bildirilmiştir (Nieto vd. 2009).

4.3.5 Tiyobarbiturik asit reaktif maddesi (TBARM)

Farklı fraksiyonlarda ve konsantrasyonlarda peptit ilave edilerek üretilen sucuklarda üretim boyunca TBARM sayısındaki değişim çizelge 4.10'da verilmiştir. Sucuklara ait TBARM sayıları üretim süresince artmıştır. Peptit ilavesi ve üretim süresi arasında interaksiyon tespit edilmiştir ($P<0.01$). Sucuğa peptit ilavesi üretim başlangıcında bile TBARM değerini sayısal olarak düşürmüştü ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). K grubunda 6. günden sonra oksidasyonun diğer gruplara kıyasla daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. Lipit oksidasyonunun en düşük seviyede olduğu gruplar 3P2 (0.64 ± 0.09) ve 10P2 (0.59 ± 0.04)'dir. 12. günde TBARM değerindeki artış hızı bir miktar azalmış, ancak, K örneklerinde peptit ilaveli gruplardan daha yüksek seyretmiştir. Farklı oranlarda peptit fraksiyonları içeren sucuklar arasında en düşük TBARM değerleri 10P1 ve 10P2'de belirlenmiştir. Üretim sonunda 10P2'nin TBARM değeri (0.66 ± 0.04) peptit ilavesiz örneklerin başlangıç TBARM değerinden (0.71 ± 0.08) daha düşüktür. 3 kDa molekül ağırlığında peptitler, oksidatif reaksiyonlar üzerine 10 kDa'luk peptitlerden daha az etkili olmuştur. Molekül ağırlığına dikkate alınmadığında yüksek oranda peptit ilavesinin lipit oksidasyonunu geciktirmede daha etkili olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.10 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda TBARM değerinde (mg MDA/kg) üretim süresince meydana gelen değişim

Uygulama	Üretim süresi (gün)		
	0	6	12
K	0.71 ± 0.08^{Ca}	0.99 ± 0.17^{Ba}	2.02 ± 0.09^{Aa}
3P1	0.66 ± 0.18^{Ca}	0.78 ± 0.09^{Bb}	1.05 ± 0.16^{Ab}
3P2	0.61 ± 0.10^{Ba}	0.64 ± 0.09^{Bb}	0.84 ± 0.11^{Abc}
10P1	0.67 ± 0.06^{Ba}	0.70 ± 0.09^{ABb}	0.78 ± 0.09^{Ac}
10P2	0.54 ± 0.05^{Ba}	0.59 ± 0.04^{Bc}	0.66 ± 0.04^{Ac}

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, üretim süresince günler arası farklılıkları ($P<0.01$); a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$).

Depolama sırasında sucukların TBARM değerlerinde meydana gelen değişim çizelge 4.11’de sunulmuştur. Peptit ilavesi ile depolama süresi arasında interaksiyon olmaksızın ($P>0.05$) her iki faktörün de etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Lipit oksidasyonunun en düşük seviyede belirlendiği grup 10P2 (0.94 ± 0.05) ve en yüksek olduğu grup ise K (2.38 ± 0.12) olmuştur. Depolama başlangıcında 1.07 ± 0.10 olan TBARM değeri depolama sonunda 0.60 birimlik artış göstermiştir. Üretim başlangıcından depolama sonuna kadar TBARM değerlerinde meydana gelen artış miktarı K, 3P1, 3P2, 10P1 ve 10P2 gruplarında sırası ile 1.91, 1.04, 0.85 ,0.68 ve 0.67 birimdir.

Çizelge 4.11 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda TBARM değerinde depolama süresince meydana gelen değişim

Uygulama	Depolama süresi (ay)				
	0	1	2	3	Ortalama
K	2.02 ± 0.09	2.39 ± 0.28	2.47 ± 0.05	2.62 ± 0.06	2.38 ± 0.12^a
3P1	1.05 ± 0.16	1.24 ± 0.25	1.66 ± 0.50	1.71 ± 0.12	1.41 ± 0.22^b
3P2	0.84 ± 0.11	1.13 ± 0.09	1.38 ± 0.13	1.46 ± 0.08	1.20 ± 0.10^c
10P1	0.78 ± 0.09	1.11 ± 0.19	1.25 ± 0.12	1.35 ± 0.07	1.12 ± 0.10^c
10P2	0.66 ± 0.04	0.83 ± 0.02	1.05 ± 0.06	1.21 ± 0.11	0.94 ± 0.05^d
Ortalama	1.07 ± 0.10^C	1.34 ± 0.16^B	1.56 ± 0.17^A	1.67 ± 0.09^A	

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları ($P<0.01$); a-d: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$).

Yapılan çalışmalar peptit ve hidrolizat ilavesinin lipit oksidasyonunu geciktirmede etkili olduğunu göstermiştir. Przybylski vd. (2016), sığır hemoglobininin enzimatik hidroliz yoluyla ürettikleri peptidin ($\alpha 137-141$) sığır kıymasına %0.1 konsantrasyonda ilavesi ile lipit oksidasyonunu %42 oranında yavaşlatmışlardır. Yekta vd. (2020), kinoa peptitleri ile ürettikleri lipozomu sığır burgerlerine ilave etmiş ve %5 konsantrasyonda peptit ilaveli burgerlerde lipit oksidasyonunun daha yavaş gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

4.3.6 Sülfidril

Farklı konsantrasyonlarda peptit ilavesiyle üretilen sucuklarda protein oksidasyonunda meydana gelen değişim çizelge 4.12’de verilmiştir. Peptit ilavesi ve üretim süresi birbirinden bağımsız olarak protein oksidasyonu üzerinde etkili olmuştur. Başlangıçta (0. gün) yüksek oranda sülfidril içeren sucuklarda (26.70 ± 4.90 μmol sülfidril/mg) sülfidril gruplarının (-SH) protein oksidasyonuna bağlı olarak parçalanması sonucu üretim sonuna kadar kademeli olarak sülfidril miktarı azalmıştır. 12. günde ise en düşük sülfidril miktarı (13.29 ± 1.51) belirlenmiştir. Protein oksidasyonu, ilave edilen peptitlerin molekül ağırlığı ve konsantrasyonuna bağlı olmaksızın peptit ilaveli sucuklarda K’dan daha düşük miktarda belirlenmiştir. K sucuklarının sülfidril miktarı 18.17 ± 3.68 μmol sülfidril/mg protein iken, 10P2’nin sülfidril miktarı 20.02 ± 1.69 μmol sülfidril/mg protein’dir.

Çizelge 4.12 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda sülfidril miktarında (μmol sülfidril/mg protein) üretim süresince meydana gelen değişim

Uygulama	Üretim süresi (gün)			
	0	6	12	Ortalama
K	24.19 ± 6.24	18.15 ± 3.86	12.19 ± 0.93	18.17 ± 3.68^b
3P1	26.40 ± 4.07	22.23 ± 1.36	14.05 ± 0.98	20.89 ± 2.13^a
3P2	28.61 ± 7.79	19.51 ± 2.78	12.98 ± 0.79	20.37 ± 3.79^a
10P1	27.98 ± 6.34	22.76 ± 4.51	13.91 ± 3.59	21.55 ± 4.81^a
10P2	26.35 ± 0.04	20.39 ± 3.76	13.32 ± 1.25	20.02 ± 1.69^a
Ortalama	26.70 ± 4.90^A	20.61 ± 3.26^B	13.29 ± 1.51^C	

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları ($P < 0.01$); a-b: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$).

Depolama sırasında protein oksidasyonunda meydana gelen değişimin peptit ilavesi ve depolama süresi interaksiyonundan etkilenmediği görülmektedir (Çizelge 4.13). Fakat, depolama süresi ($P < 0.01$) ve peptit ilavesi ($P < 0.05$) sülfidril miktarında meydana gelen değişim üzerinde önemli etkiye sahiptir. Depolamanın 1. ve 2. aylarında sülfidril miktarında başlangıca göre azalma gözlenirken depolama sonunda artış olduğu belirlenmiştir. Üretim sırasında olduğu gibi, depolamada da peptit ilaveli gruplar arasında

önemli fark tespit edilmemiştir. Ancak, K örnekleri ile kıyaslandığında sülfidril gruplarının peptit ilaveli sucuklarda önemli düzeyde korunduğu görülmüştür. K sucuklarının sülfidril miktarı 10.23 ± 2.29 η mol sülfidril/mg protein iken peptit içeren sucuklarda yaklaşık olarak 12.84 ± 2.19 η mol sülfidril/mg protein belirlenmiştir.

Çizelge 4.13 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklarda sülfidril miktarında depolama süresince meydana gelen değişim

Uygulama	Depolama süresi (ay)				
	0	1	2	3	Ortalama
K	12.19 ± 0.93	9.96 ± 4.27	9.71 ± 2.96	9.06 ± 1.01	10.23 ± 2.29^b
3P1	14.05 ± 0.98	12.12 ± 1.58	12.41 ± 3.35	13.83 ± 2.89	13.10 ± 2.20^a
3P2	12.98 ± 0.79	10.73 ± 0.77	11.20 ± 2.40	13.50 ± 3.78	12.10 ± 1.94^a
10P1	13.91 ± 3.59	11.88 ± 0.56	11.84 ± 1.16	14.08 ± 3.53	12.93 ± 2.21^a
10P2	13.32 ± 1.25	11.75 ± 2.17	11.66 ± 1.77	16.14 ± 4.38	13.22 ± 2.39^a
Ortalama	13.29 ± 1.51^A	11.29 ± 1.87^B	11.36 ± 2.33^B	13.32 ± 3.12^A	

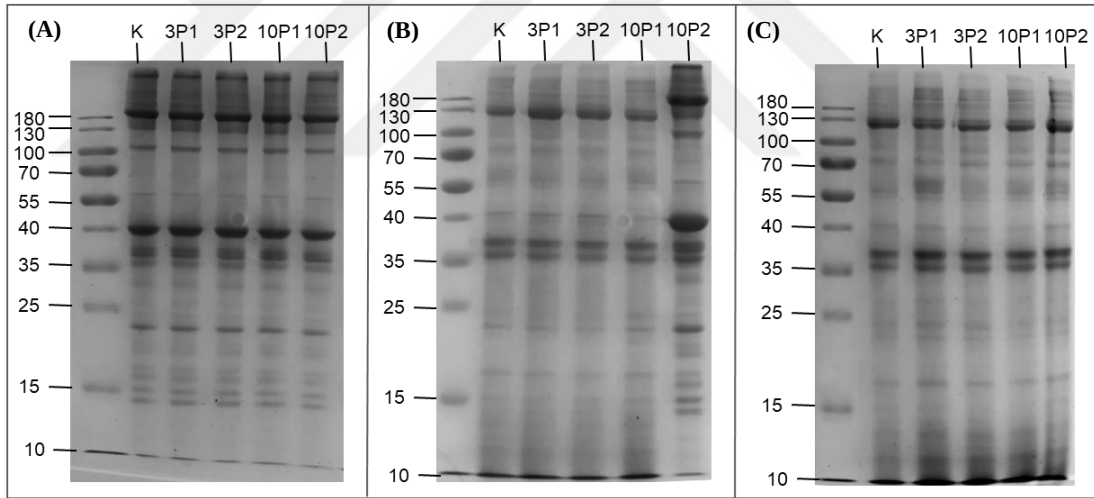
Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli A,B: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, depolama süresince aylar arası farklılıkları ($P < 0.01$); a,b: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

4.3.7 Miyofibriler proteinlerde SDS-PAGE

Sucukların SDS-PAGE profil analizinden elde edilen jel görüntüleri şekil 4.18’de gösterilmektedir. 0. gün itibariyle, kontrol ve peptit içeren gruplar dahil olmak üzere tüm gruplarda benzer bir degradasyon profili izlenmiştir. Ayrıca, yaklaşık 40 kDa civarında bantlar tüm gruplarda benzer yoğunlukta görüntülenmiştir. Özellikle, 10-15 kDa aralığında diğer günler ile kıyaslandığında düşük bant yoğunlukları gözlenmiştir. 12. günden itibaren 180 kDa’un üzerindeki bant yoğunlukları azalmıştır. ~200 kDa seviyesinde görüntülenenen myosin proteini, 12. ve 102. günlerde tamamen degrade olmuştur. K örneklerinin 15-25 kDa aralığında peptit ilaveli gruplara kıyasla daha düşük bant yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Başlangıç görüntüleri ile karşılaştırıldığında örnek grupları arasında bazı farklılıklar belirgin hale gelmiştir. Tüm gruplarda 10 kDa’dan büyük bantların yoğunluğunda artış olmasına rağmen, K grubunda ~18 kDa altında peptit bantlarının yoğunluğu daha düşüktür. Peptit ilaveli sucukların bant

yoğunluklarının K'dan daha yüksek olması, özellikle 10 kDa MA'lı peptitlerin antioksidan aktivitelerinden kaynaklanıyor olabilir. Depolamanın sonunda (102. gün), tüm sucuklarda ~150 kDa civarındaki proteinler degradasyona uğramıştır. 10P2'de 102. günde 58 kDa molekül ağırlığına sahip bantlar, K, 3P1 ve 3P2'ye göre daha düşük yoğunlukta belirlenmiştir. Aynı grupta 38 kDa molekül ağırlığı aralığında ise daha yüksek yoğunlukta bantlar görüntülenmiştir. Ayrıca, 12 kDa MA'lı peptit bantları belirgin hale gelmiştir.

Uygulanan SDS-PAGE yöntemi ile 10 kDa'dan daha düşük MA'lı bantlar görüntülenemediğinden peptit ilavesinin neden olduğu farklılık belirlenememiştir. Ancak, görüntülenenen daha yüksek molekül ağırlıklı bantların yoğunluklarının azalması ve yeni bantların oluşumu, sucukların fermantasyon ve depolama sürecinde dinamik proteolitik süreçlerin meydana geldiğini göstermektedir (Candogan vd. 2009).



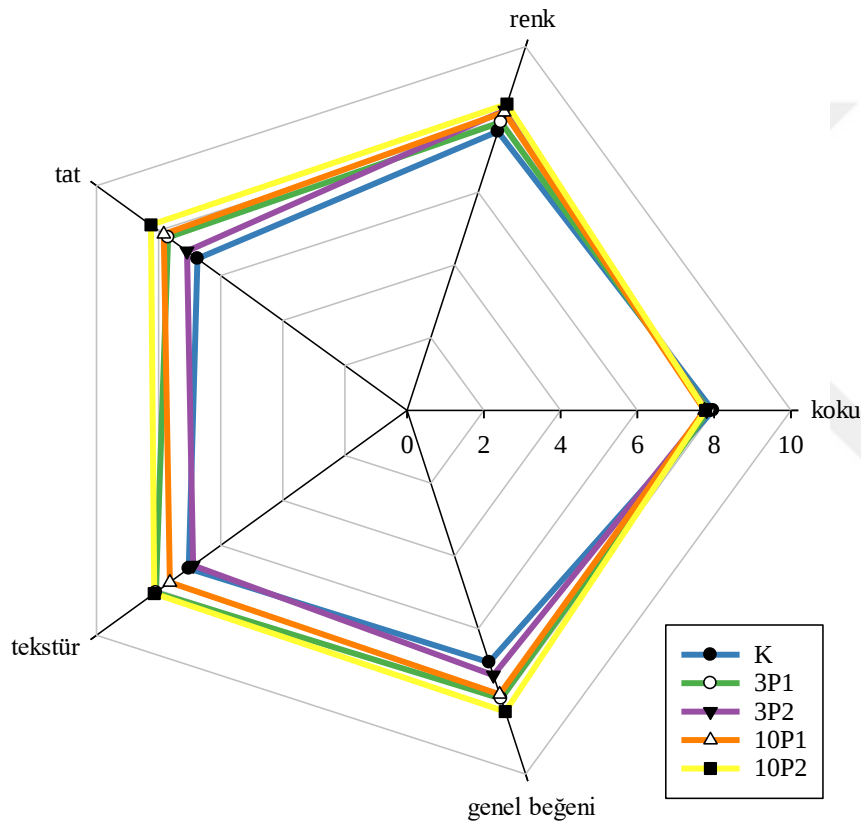
Şekil 4.18 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklardan ekstrakte edilen miyofibriler proteinlerde protein degradasyonu

0.gün (A), 12. gün (B), 102. gün (C). K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

4.3.8 Duyusal

Üretim sonunda çiğ sucuklara ait duyusal değerlendirme puanları şekil 4.19'da verilmiştir. Çiğ sucuklar arasında 3P1 ve 10P2 tat, tekstür ve genel beğeni yönünden en

yüksek puana sahip gruplardır. Sucuklar arasında koku yönünden önemli bir farklılık görülmektedir. K ve 3P1 renk yönünden diğer gruplar ile kıyaslandığında daha düşük puanlandırılmıştır (Çizelge 4.14). 3P2, 10P1 ve 10P2'ye ait puanlar sırasıyla 8.25, 8.20 ve 8.42'dir. K ve 3P2 sucuklarına ait tat, tekstür ve genel beğeni puanları peptit ilaveli sucuklara verilen puanlardan daha düşüktür. Tat, tekstür ve genel beğeni puanları en yüksek grup ise 10P2'dir. 10P2'nin tat, tekstür ve genel beğeni puanları sırasıyla 8.25, 8.14 ve 8.28'dir.



Şekil 4.19 Çiğ sucuklarda üretim sonunda (12. gün) duyu analizi puanları

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

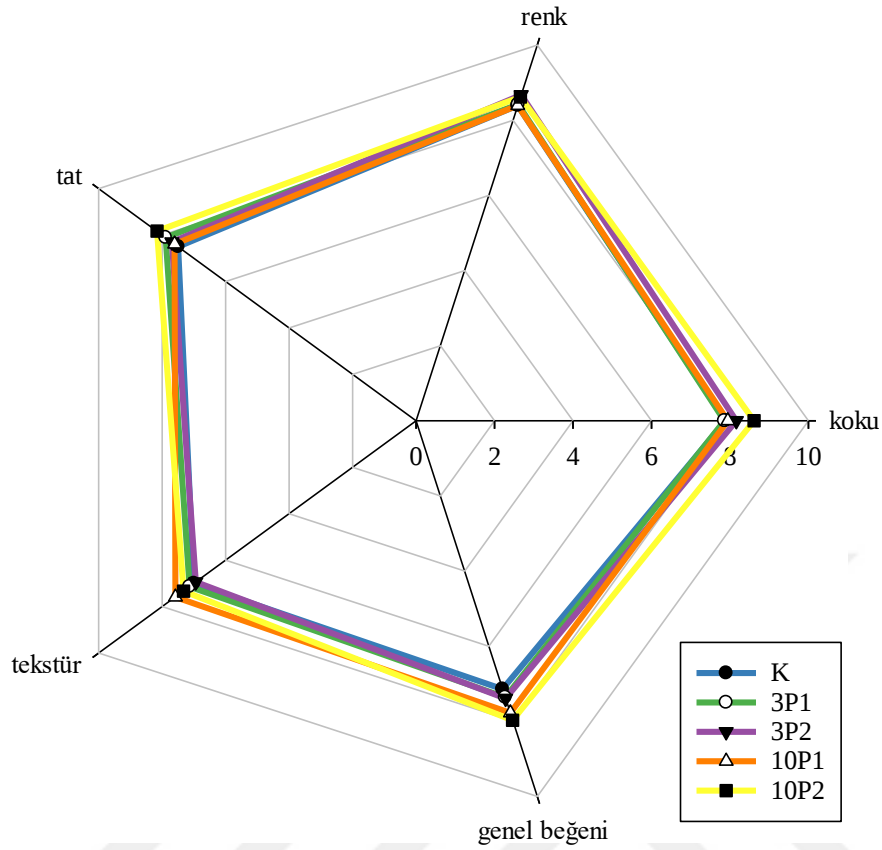
Çizelge 4.14'te görüldüğü üzere pişmiş sucuklarda üretim sonunda koku yönünden en yüksek puan 10P2 (8.62) ve en düşük puan K (7.89) gruplarına verilmiştir ($P < 0.05$). En yüksek renk puanları 3P2 ve 10P2'ye aittir. Tat yönünden, panelistler tarafından en yüksek puanlandırılan grup 10P2 (8.17), en düşük puanlandırılan grup ise K (7.50) olmuştur. K, 3P1 ve 3P2 örneklerinin tekstür puanları birbirleri ile benzerdir ($P > 0.05$). Ancak 10P1 ve 10P'nin tekstür yönünden daha iyi olduğu görülmektedir. Şekil 4.20'de

de görüldüğü üzere üretim sonunda genel beğeni yönünden en yüksek puanlandırılan sucuklar 10P1 ve 10P2 olmuştur. 10P2 sucukları K'den yaklaşık 0.8 birim daha yüksek puan almıştır. Panelistler, üretim sonunda çiğ ve pişmiş sucuklarda herhangi bir yabancı tat ve koku algılamadıklarını belirtmişlerdir.

Çizelge 4.14 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen çiğ ve pişmiş sucuklarda üretim sonunda belirlenen duyusal değerlendirme puanları

Uygulama	koku	renk	tat	tekstür	genel beğeni
Çiğ					
K	7.97±0.03	7.67±0.34 ^b	6.75±0.42 ^c	7.03±0.03 ^b	6.92±0.14 ^b
3P1	7.86±0.36	7.92±0.25 ^b	7.70±0.42 ^b	8.09±0.02 ^a	7.92±0.14 ^a
3P2	7.81±0.14	8.25±0.47 ^a	7.09±0.48 ^c	6.89±0.11 ^b	7.28±0.22 ^b
10P1	7.75±0.03	8.20±0.14 ^a	7.84±0.17 ^{ab}	7.64±0.14 ^a	7.81±0.09 ^a
10P2	7.78±0.22	8.42±0.25 ^a	8.25±0.31 ^a	8.14±0.53 ^a	8.28±0.28 ^a
Pişmiş					
K	7.89±0.33 ^b	8.39±0.61 ^b	7.50±0.06 ^b	7.00±0.56 ^b	7.14±0.36 ^b
3P1	7.86±0.42 ^b	8.42±0.14 ^b	7.89±0.22 ^{ab}	7.14±0.36 ^b	7.36±0.14 ^b
3P2	8.17±0.06 ^b	8.67±0.11 ^a	7.70±0.02 ^b	6.94±0.50 ^b	7.39±0.00 ^b
10P1	7.95±0.17 ^b	8.39±0.28 ^b	7.61±0.39 ^b	7.59±0.59 ^a	7.78±0.17 ^a
10P2	8.62±0.05 ^a	8.62±0.05 ^a	8.17±0.28 ^a	7.33±0.50 ^a	7.97±0.47 ^a

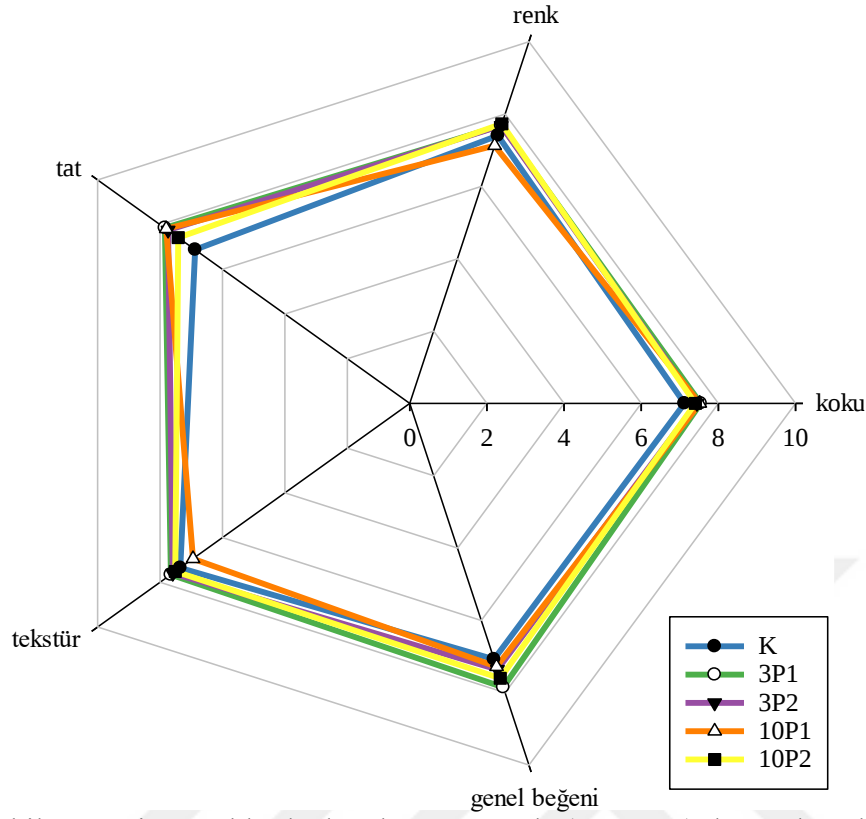
Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. a-b: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir (P<0.05).



Şekil 4.20 Pişmiş sucuklarda üretim sonunda (12. gün) duyusal analiz puanları

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli

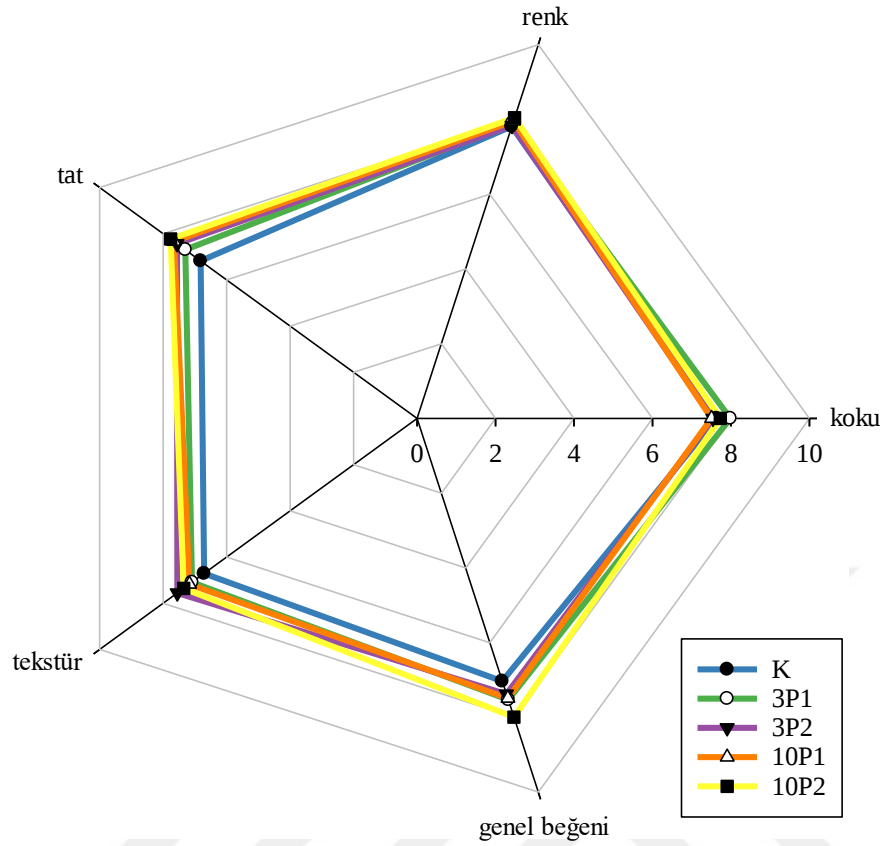
Depolama sonunda çiğ sucukların koku puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Örnekler arasında K ve 10P1 grupları renk yönünden diğer gruplara göre daha düşük puanlandırılmıştır (Şekil 4.21). Renk ve tekstür yönünden en düşük puana sahip grup 10P1 olmuştur. En yüksek tat puanları 3P1, 3P2 ve 10P1 gruplarına verilmiştir. Genel beğeni yönünden 3P1 (7.85) ve 10P2 (7.60) en beğenilen grup iken, K grubu en az beğenilen (7.07) gruptur.



Şekil 4.21 Çiğ sucuklarda depolama sonunda (102. gün) duyusal analiz puanları

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

Depolama sonunda pişmiş örneklerin koku puanları birbirine yakın olup en yüksek puanlandırılan grup 3P1 olmuştur (Şekil 4.22). Sucuklarda renk yönünden farklılık görülmemiştir ($P>0.05$). En düşük tat puanı K grubuna (6.82), en yüksek puan ise 10P2 (7.76) grubuna verilmiştir (Çizelge 4.15). Tekstür yönünden değerlendirilen sucuklar arasında en beğenilen grup 3P2 olmuştur. Genel beğeni yönünden en yüksek puanlandırılan grup 10P2 (7.99), en düşük puanlandırılan grup ise K (7.03) olmuştur.



Şekil 4.22 Pişmiş sucuklarda depolama sonunda (102. gün) duyu analizi puanları

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli.

Çizelge 4.15 Farklı oranlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen çiğ ve pişmiş sucuklarda depolama sonunda belirlenen duyu değerlendirme puanları

Uygulama	koku	renk	tat	tekstür	genel beğeni
Çiğ					
K	7.13±0.13	7.40±0.15 ^b	6.88±0.13 ^c	7.35±0.02 ^a	7.07±0.18 ^b
3P1	7.54±0.21	7.68±0.43 ^a	7.85±0.40 ^a	7.65±0.10 ^a	7.85±0.40 ^a
3P2	7.44±0.44	7.67±0.55 ^a	7.74±0.37 ^a	7.60±0.85 ^a	7.35±0.48 ^{ab}
10P1	7.52±0.30	7.13±0.13 ^b	7.81±0.31 ^a	6.94±0.06 ^b	7.28±0.28 ^{ab}
10P2	7.40±0.15	7.73±0.60 ^a	7.42±0.08 ^b	7.51±0.26 ^a	7.60±0.15 ^a
Pişmiş					
K	7.63±0.26 ^{ab}	7.81±0.19	6.82±0.07 ^b	6.71±0.04 ^b	7.03±0.03 ^c
3P1	7.99±0.24 ^a	7.90±0.35	7.31±0.19 ^{ab}	7.09±0.53 ^{ab}	7.53±0.47 ^b
3P2	7.54±0.21 ^b	7.83±0.17	7.56±0.56 ^a	7.56±0.44 ^a	7.38±0.38 ^b
10P1	7.51±0.38 ^b	7.95±0.17	7.66±0.22 ^a	7.17±0.05 ^{ab}	7.49±0.26 ^b
10P2	7.73±0.60 ^{ab}	8.04±0.29	7.76±0.01 ^a	7.35±0.02 ^{ab}	7.99±0.15 ^a

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. a-b: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

Gerek çiğ, gerekse pişmiş sucuklar arasında peptit ilave edilen sucuklar K grubundan daha yüksek puana sahiptir. Peptit ilavesinin sucukların duyusal kalitesi üzerine olumlu etkisi söz konusu olup, panelistler tarafından yabancı tat ve koku algılanmamıştır.

Verma vd. (2022), domuz kanı ve karaciğeri hidrolizatlarını ilave ettikleri domuz somununda depolama süresince duyusal analiz gerçekleştirmişlerdir. İki farklı yöntemle ambalajladıkları ürünlerin (MAP ve aerobik) duyusal değerlendirme puanlarının 7. güne kadar farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. 7. günden sonra ise hidrolizat ilaveli örneklerin renk, görünüş, sululuk, tekstür ve aroma yönlerinden daha yüksek puanlara sahip olmuştur. Et ürünlerinin rengi, mikrobiyal çoğalma, yağ ve protein oksidasyonu ile pigmentlerin mikroorganizmalar tarafından oksidasyonu gibi faktörlerden etkilenir. Tekstür özellikleri ise proteinlerin su tutma kapasitesinde meydana gelen değişim ile ilişkilidir. Çalışmamızda, peptit ilavesi genel olarak K grubundan daha yüksek puanlandırılmıştır. Şekil 4.23'te görüldüğü üzere K sucukları daha açık renkli ve tekstürel olarak daha gevşek yapıya sahiptir. Tat yönünden peptit ilaveli grupların daha fazla beğenilmesi fermentasyon ve depolama süresince lezzeti olumlu etkileyen umami peptitlerinin (örneğin aspartat, glutamat vb.) varlığı ile ilişkili olabilir. Bu peptitler asidik karakter ve düşük molekül ağırlığına (~500 Da) sahiptir. Gıda ürünlerine biyoaktif peptit ilavesinde araştırmacıların en büyük endişelerinden biri olan bitter tat oluşumu hidrolizde kullanılan enzimlerle ve nihayetinde meydana gelen amino asitlerle yakından ilişkilidir (Chen vd. 2023). Papain ve bromelain enzimlerinin bitter özelliğe sahip peptit oluşumunu artırdığı bildirilmiştir. Gıdaya ilave edilecek peptitlerin bitter özellik taşıması için ekzo-proteazlardan yararlanılması daha uygun olabilir. Ayrıca hidrofobik niteliğe sahip peptitlerin bitter tat oluşturma potansiyeli daha yüksektir (Fu vd. 2018). Çalışmamızda ise hidrolizde endo-proteazlar tercih edilmesinin başlıca sebebi antoksidan aktivitenin artmasını sağlamaktır. Ancak, hidrolizatın peptit fraksiyonlarına ayrılmasında yalnızca suda çözünür (hidrofilik) kısımdan yararlanılmıştır. Bu durum, peptit ilavesinin sucuğun duyusal özelliklerinde olumsuz etki yaratmamasının, hatta daha iyi duyusal özelliklere sahip olmasını sağlamasının en muhtemel nedeni olarak gösterilebilir.



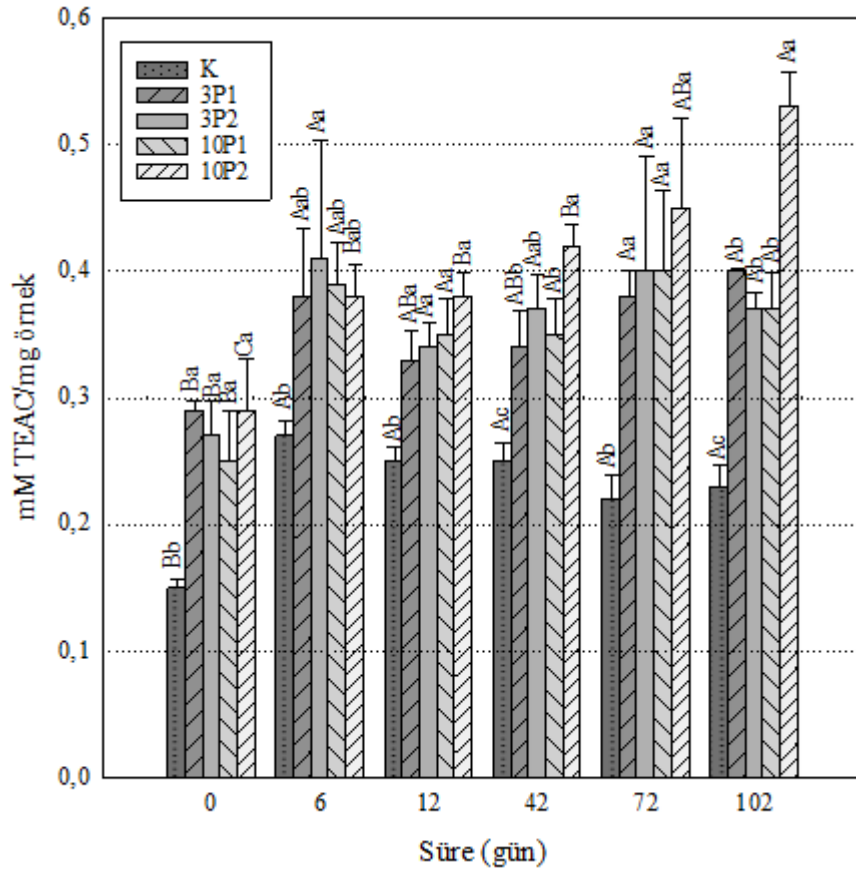
Şekil 4.23 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilave edilen çiğ sucuklar (12. gün)

4.4 Peptit Ekstraktlarında Yürütülen Analiz Sonuçları

4.4.1 Antioksidan aktivite

Üretim ve depolama sürecinde farklı molekül ağırlığı ve konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucuklardan ekstrakte edilen peptitlerin antioksidan aktiviteleri ile süre faktörü arasında interaksiyon olduğu belirlenmiştir ($P < 0.01$). K'ün radikal söndürme aktivitesi, üretim ve depolama süresince 0.15-0.27 mM/mg TEAC aralığında belirlenmiştir (Şekil 4.24). Başlangıçtan itibaren peptit ilaveli sucuklarda antioksidan aktivitesin yüksek olması ve bu durumun depolama süresince değişmemesi ilave edilen peptitlerin stabil kaldığını göstermiştir. En yüksek antioksidan aktivite, proteoliz yoluyla yeni peptit oluşumunun en yüksek seviyeye ulaştığı 6. günde elde edilmiştir. 10P2'den ekstrakte edilen peptitlerde 0. günde 0.29 mM/mg TEAC olarak belirlenen RSA, üretim sonunda 6. gün ile aynı seviyede olup 0.38 mM/mg TEAC olarak ölçülmüştür.

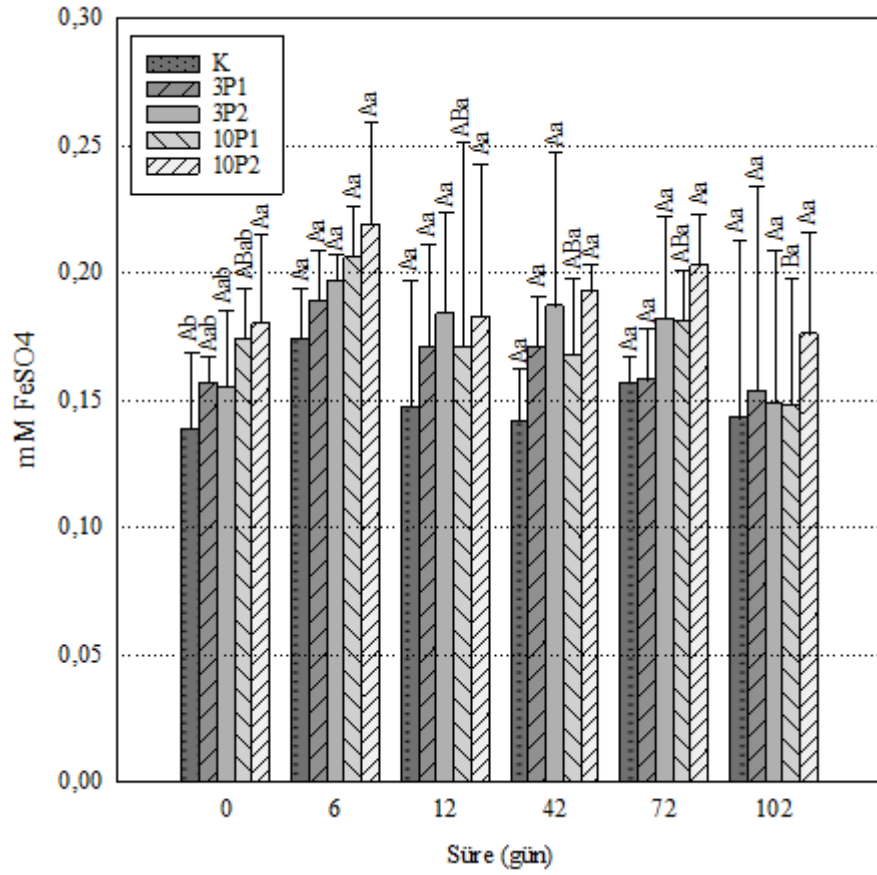
Depolama sırasında K grubunun antioksidan aktivitesi azalırken, özellikle 10P2'de gözlenen artış dikkat çekmektedir. Başlangıç değeri (0.29 mM TEAC/mg) ile (0.gün) kıyaslandığında depolama sonunda radikal söndürme aktivitesinin yaklaşık olarak iki katına (0.53 mM TEAC/mg) çıktığı belirlenmiştir. Peptit ilaveli sucuklardan ekstrakte edilen peptitlerde meydana gelen bu değişimin, fraksiyonların içerisindeki büyük molekül ağırlıklı peptitlerin daha küçük peptitlere parçalandığının göstergesi olduğu düşünülmektedir. En yüksek antioksidan aktivitenin 10 kDa molekül ağırlıklı peptitlerin yüksek oranda ilave edildiği sucukta gerçekleşmiş olması ise bu olasılığı güçlendirmektedir.



Şekil 4.24 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince radikal yakalama aktivitesinde meydana gelen değişim

K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, üretim ve depolama süresince günler arası farklılıkları ($P < 0.01$); a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Şekil 4.25'te farklı konsantrasyonlarda peptit ilavesiyle üretilen sucuklardan ekstrakte edilen peptitlerin FRAP yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitesinde üretim ve depolama sırasında meydana gelen değişim gösterilmektedir. Üretim başlangıcında en yüksek demir indirgeme gücü 10P2'de belirlenmiştir. 6. günde sucukların antioksidan aktiviteleri arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. ($P > 0.05$). Süre faktörü yalnızca 10P1 üzerine etkili olmuştur. Bu örneklerin 6. günde en yüksek seviyeye ulaşan antioksidan aktivitesi, depolama sonunda en düşük seviyede belirlenmiştir. Üretim ve depolama sırasında 0. gün haricinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenememiş olsa da, sayısal olarak en yüksek FRAP değerleri 10P2'den elde edilmiştir.



Şekil 4.25 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince demir indirgeme gücünde meydana gelen değişim

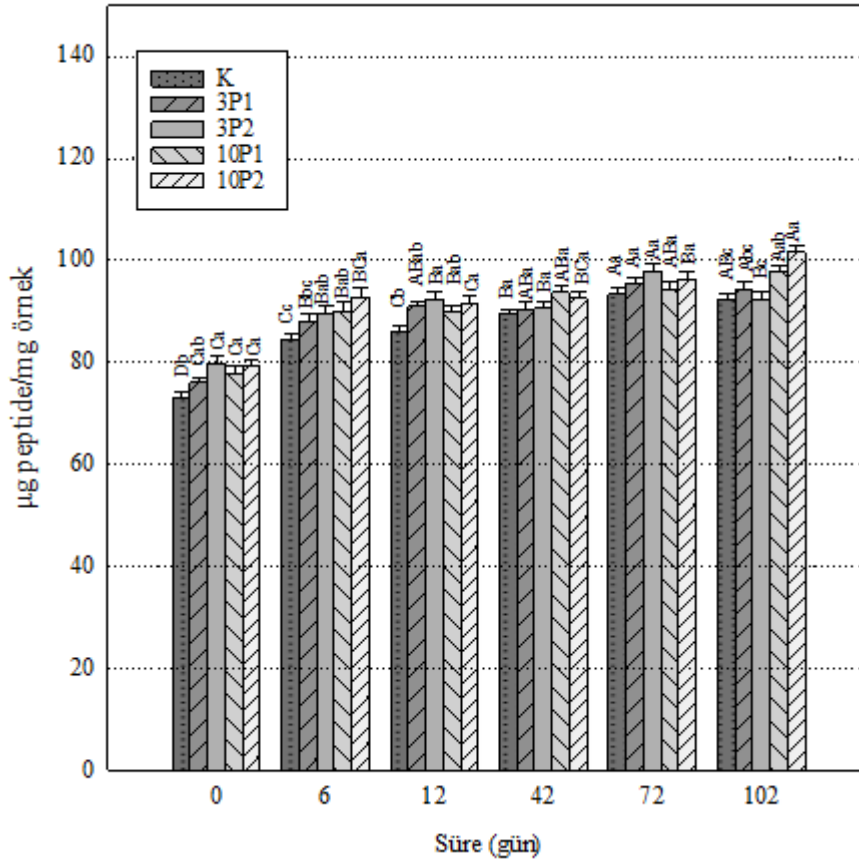
K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, üretim ve depolama süresince günler arası farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P < 0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

Peptit ekstraktlarına ait antioksidan aktivite sonuçları, sucuğa ilave edilen peptitlerin sucuk ortamında radikal söndürme ve demir indirgeme kabiliyetlerini ortaya koymuştur. Çalışmadaki K grubu, fermentasyon yoluyla oluşan peptitleri temsil etmektedir. Yalnızca fermentasyon etkisiyle, Radikal söndürme aktivitesinin 0.15 mM TEAC'tan (0. gün), 0.27 mM TEAC'a (6. gün) ve indirgeyici gücün 0.14'ten (0. gün), 0.17 mM FeSO₄'e (6. gün) yükselmiştir. Yani, 6. günde belirlenen bu değerlerin üzerindeki kısımdan, ilave edilen peptitlerin sorumlu olduğu sonucuna ulaşılabilir. Ancak, ilave edilen peptitlerin depolama sırasında degradasyona uğradığı ve bu degradasyonun antioksidan aktiviteyi artırıcı etki yaptığı unutulmamalıdır.

Peptitlerin gıda ürünlerine dahil edilmesindeki en önemli zorluklardan biri, işlem ve depolama sırasında stabilite ve biyoaktivitenin kaybıdır. Ashaolu vd. (2023) tarafından yapılan derlemede vurgulandığı gibi, birçok çalışma, peptitlerin stabilitesi üzerine işleme koşullarının etkisini incelemiştir. Ancak, bu çalışmaların çoğu termal işleme odaklanırken, diğerleri in vitro çalışmalardır. Bununla birlikte, bu çalışma, biyoaktif peptitlerin (BP'ler) fermente gıda ürünlerinde bileşen olarak ticarileştirilmesine yönelik büyük potansiyele sahiptir. Ayrıca, düşük molekül ağırlıklı peptitlerin daha yüksek antioksidan kapasitelerine sahip olduğu bilinmektedir (Hernández-Ledesma vd. 2011). Ancak, bu çalışma, sucukları 10 kDa peptitlerle formüle etmenin daha güçlü bir antioksidan etki sağladığını göstermiştir, çünkü bu peptitler 3 kDa peptitleri de içerecektir. Ayrıca, uzun süreli süreçte 10 kDa peptitlerin bozunması, antioksidan aktivitenin sürekliliğine katkıda bulunmuş olabilir. Önceki çalışmalar, farklı türdeki fermente et ürünlerinden peptit ekstraksiyonu yaparak antioksidan aktivitelerini değerlendirmiştir. Araştırmacılar, bu ürünlerde DPPH yöntemiyle ölçülen, kurutma süresine bağlı olarak %50 ila %92 arasında değişen önemli serbest radikal temizleme potansiyeli bildirmişlerdir (Gallego vd. 2018, Sun vd. 2009, Vaştag vd. 2010). Deniz vd. (2016) pastırma üretimi sırasında antioksidan peptitlerin meydana geldiğini, üretimin ileri dönemlerinde ise serbest amino asit miktarının arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca, diğer araştırmalar, farklı protein hidrolizatları ve peptitlerin domuz somunu (Verma vd. 2022), bufalo eti (El-Saadony vd. 2021), dana burger (Yekta vd. 2020) ve dana kıyma (Przybylski vd.2016, Wang vd. 2021) kalitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Ancak, bu çalışmalar, eklenen peptitlerin / hidrolizatların antioksidan potansiyelini veya stabilitesini rapor etmemiştir.

4.4.2 Peptit konsantrasyonu

Şekil 4.26, sucukların üretim ve depolama süreci boyunca peptit konsantrasyonundaki değişimleri göstermektedir. Peptit fraksiyonlarıyla zenginleştirilmiş sucuklarda ($P<0.01$) 0. günden itibaren dikkate değer yüksek değerler gözlenmiştir. Fermantasyon, antioksidan aktivitedeki artışla ($r=90$) uyumlu olarak, yeni peptitlerin oluşumuyla peptit konsantrasyonunu artırmıştır. Olgunlaşma sürecinin sonunda (12. gün) peptitlerin en yüksek konsantrasyonları 3P2 ve 10P2 örneklerinde ölçülmüştür.



Şekil 4.26 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonlarını içeren sucukların üretim ve depolama süresince peptit konsantrasyonlarında meydana gelen değişim

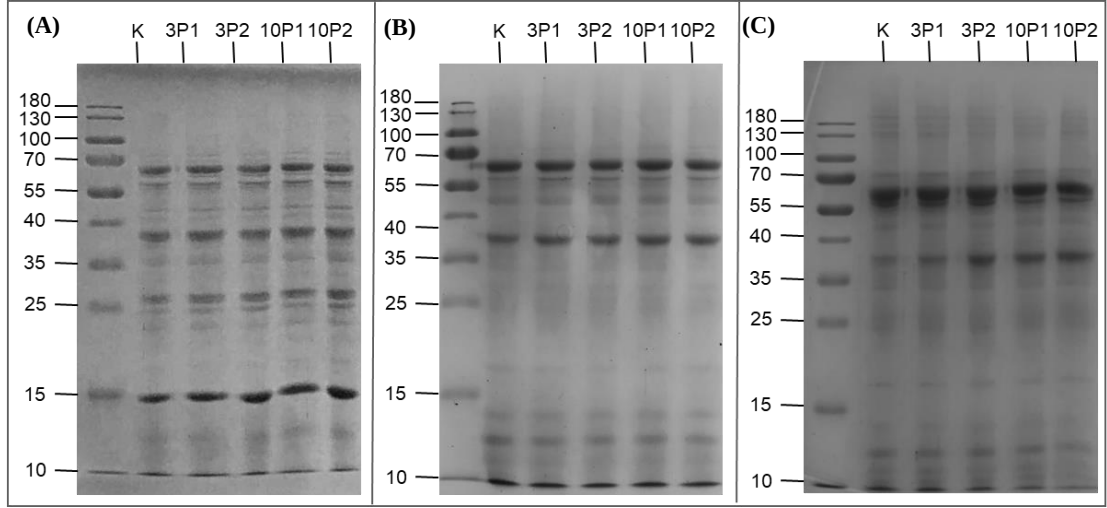
K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli. A-C: Farklı büyük harfle gösterilen değerler, üretim ve depolama süresince günler arası farklılıkları ($P<0.01$); a-c: Farklı küçük harfle gösterilen değerler, uygulama grupları arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($P<0.01$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Depolama süresi boyunca kontrol (K) örnekleri, muamele edilen gruplarla karşılaştırılabilir peptit üretimi sergilemiştir. Ancak, 10 kDa peptitlerin eklenmesi, 102. günde en yüksek peptit konsantrasyonuna yol açmıştır. 3P1 ve 3P2 örneklerinde gözlenen önemli derecede düşük peptit içeriği, 3 kDa peptitlerin serbest amino asitlere parçalanmasıyla ilişkilendirilebilir. Öte yandan, örneklerde 10 kDa peptitlerin bulunması, daha düşük molekül ağırlıklı yeni peptitlerin oluşumuna katkıda bulunmuş olabilir. Kontrol grubunun peptit miktarı, literatürde bildirilen değerlerle uyumlu olmakla birlikte, literatürde peptit ilave edilen herhangi bir et ürününden peptit ekstraksiyonu gerçekleştirilmediği için literatürle kıyaslanması mümkün olmamıştır. Birçok çalışma,

starter kültür veya proteolitik enzimlerin fermente sucuklardaki peptit konsantrasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Yu vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışma, fermente sosislere starter kültür inokule edildiğinde peptit konsantrasyonu üzerinde önemli bir etki olmadığını bildirmiştir. Diğer çalışmalar ise starter kültür ilavesinin fermente sosislerin peptit içeriğini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Huang vd. 2022; Luan vd. 2020).

4.4.3 SDS-PAGE

Farklı konsantrasyonlarda peptit ilavesiyle üretilen sucuklardan ekstrakte edilen peptitlerde SDS-PAGE analiz sonuçları şekil 4.27’de gösterilmektedir. Başlangıçta (0. gün), kontrol ve peptit içeren gruplar dahil olmak üzere tüm örneklerde protein degradasyonu benzer şekilde gerçekleşmiştir. 12. günde 55-70 kDa aralığındaki protein bant yoğunluğunda artış meydana gelmiştir. Ayrıca, 35-40 kDa civarında bant yoğunlukları tüm gruplarda benzerdir. 0. günde 10-15 kDa aralığında düşük yoğunlukta olan bantlar 12. günde daha yoğun olarak görüntülenmiştir. Üretim sonunda örnek grupları arasında ortaya çıkan farklılıklar dikkat çekmiştir. 10P1 ve 10P2’de 55-70 kDa aralığındaki bantların yoğunlukları diğer gruplara kıyasla daha düşüktür. Tüm gruplarda 15-25 kDa aralığındaki bantların yoğunluğunda artış olsa da kontrol grubunda ~18 kDa altındaki bantların daha az yoğunluğa sahip olduğu gözlenmiştir. Depolama süresinin sonunda (102. gün), tüm örneklerde ~130 kDa civarındaki bantlar belirgin hale gelmiştir. Ayrıca, 12 kDa’luk bantlar ortaya çıkmıştır. İlave edilen peptitler düşük molekül ağırlığına sahip olduğundan jeller üzerinde görüntülenememiştir. Yüksek molekül ağırlıklı bant yoğunluklarının azalması ve yeni bantların oluşumu, sucukların üretim ve depolanması sırasında proteolitik reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Peptit ekstraktlarının SDS-PAGE profili, miyofibriler proteinlerin degradasyonu ile benzerlik göstermiştir. Daha önce rapor edildiği gibi, antioksidanların et ürünlerine eklenmesi, protein oksidasyonunun hızını azaltarak proteinin parçalanmasını etkili bir şekilde yavaşlatabilir (Maqsood, vd. 2015). Bu nedenle, 10P1 ve 10P2’de görüntülenenen düşük bant yoğunlukları, ilave edilen peptitlerin 102 gün boyunca stabil olduğu ve protein oksidasyonuna karşı koruyucu bir etki sağladığı anlamına gelebilir.



Şekil 4.27 Farklı konsantrasyonlarda peptit fraksiyonu ilavesiyle üretilen sucuklardan elde edilen peptit ekstraktlarında protein degradasyonu

0.gün (A), 12. gün (B), 102. gün (C). K, kontrol grubu; 3P1 ve 3P2, %0.5 ve %1 oranında 3 kDa peptit ilaveli; 10P1 ve 10P2, %0.5 ve %1 oranında 10 kDa peptit ilaveli

5. SONUÇ

Biyoaktif peptitlerin enzimatik hidroliz yoluyla üretiminde hidroliz koşulları peptidin özelliklerini belirleyen en önemli kriterdir. Farklı enzimlerin birlikte uygulanması halinde hidroliz koşullarının optimize edilmesi önemlidir. Çünkü enzimlerin optimum çalışma koşulları değişecek, hidrolizin daha etkin gerçekleşmesi durumunda ise daha düşük konsantrasyonlar gerekecek ve maliyet azalacaktır. Bu doğrultuda, alkalaz ve protamex enzimleri ile antioksidan peptit üretiminde en uygun hidroliz parametreleri 45°C’de 24 saat olarak belirlenmiştir. Optimum olarak belirlenen koşullarda hem hidrolizatta hem de peptit fraksiyonlarında antioksidan aktivite en yüksek değere sahip olmuştur. Bu koşullarda hidrolizatın protein miktarı diğer koşullara göre daha düşük, peptit konsantrasyonu ise hem hidrolizatta hem de peptit fraksiyonlarında daha yüksektir. Belirlenen yüksek antioksidan aktivite değerleri hidroliz işleminin etkinliği ve düşük MA’lı peptitlerin meydana gelmesi ile ilişkilendirilmiştir. Optimum koşullarda üretilen hidrolizata ait SDS-PAGE profili, 50°C’de 24 saat hidroliz edilen örneklerde görüntülenen 10 kDa MA’lı peptitlerin parçalandığını göstermiştir.

Lipit dispersiyonlarına ilave edilen hidrolizat konsantrasyonunun artması ile TBARM ve konjuge dien miktarlarının daha düşük seviyelerde kalması sağlanmıştır. Oksidasyonun en düşük seviyede gerçekleştiği emülsiyonlar %0.5 hidrolizat içermektedir. Lipozomda ise konsantrasyondan bağımsız olarak lipit oksidasyonu engellenmiştir. Depolama süresince fiziksel olarak stabil görünen emülsiyonlar arasında yalnızca hidrolizat içermeyen lesitin emülsiyonunda belirgin bir faz ayrımı gerçekleşmiş, Tween-20 emülsiyonunda ise hafif bir krema oluşumu gözlenmiştir.

Mikrobiyolojik analiz sonuçları, ilave edilen peptitlerin sucuğun doğal florasını etkilemediğini göstermiştir. Laktik asit bakteri sayısının üretim ve depolama süresince K grubu ile benzer şekilde değişmesi arzu edilen bir sonuçtur. Üretim süresince 3 kDa MA’lı peptitlerin antifungal etkisi dikkat çekici olmuştur. Bu örneklerde maya ve küf gelişiminin daha erken durdurulmuş olması ürünü güvenli hale getirmektedir. Sucuklara peptit ilavesi üretimin 6. ve 12. günlerinde pH değerini bir miktar artırmıştır. Sucuk renk ve bileşimi peptit ilavesinden etkilenmemiştir ($P>0.05$) 10P2’de üretim başlangıcından

itibaren daha düşük TBARM sayısı belirlenmiştir. Depolama sırasında da lipit oksidasyonunun en yavaş seyrettiği grup 10P2'dir. Sucukların sülfidril miktarları ilave edilen peptitlerin molekül ağırlığı ve konsantrasyonlarından bağımsız olarak daha yüksek seviyede kalmış, yani protein oksidasyonu geciktirilebilmiştir. K'de ise sülfidril grupları parçalanmış, protein oksidasyonu daha hızlı gerçekleşmiştir. Miyofibriler proteinlerden elde edilen elektroforez görüntüleri, ilave edilen peptitlerin protein oksidasyonu üzerine etkisi ile açıklanmıştır. 10P1 ve 10P2'de 50 kDa'dan yüksek MA'lı bantların daha iyi korunduğu görülmüştür. Ürünün duyusal özellikleri peptit ilavesinden olumsuz etkilenmediği gibi, özellikle pişmiş üründe tat ve tekstür üzerine olumlu etkiye sahip olmuştur. Panelistler tarafından genel olarak en beğenilen sucuk grubu 10P2'dir. Üretim ve depolama süresince sucuktan ekstrakte edilen peptitlerde gerçekleştirilen analizler ilave edilen peptitlerin stabilitesinde meydana gelen değişimi belirlemeye yönelik olup, en yüksek antioksidan aktivite ve peptit konsantrasyonu 10P2'de ölçülmüştür. Üretim başlangıcı, sonu ve depolama sonunda peptit ilavesi yapılan tüm grupların radikal yakalama kapasitesi K'den daha yüksektir. Benzer şekilde peptit konsantrasyonunun da peptit ilaveli gruplarda belirgin şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Peptit ekstraktlarının SDS-PAGE profili, ilave edilen peptitlerin 102 gün boyunca stabil olduğunu ve protein oksidasyonuna karşı koruyucu bir etki sağladığını doğrulamıştır.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, biyoaktif nitelikli peptitlerin üretiminde optimizasyon aşamasının önemini ortaya koymuştur. Ayrıca karaciğerden elde edilen hidrolizatların hem emülsiyon tipi gıdaların muhafazasında hem de antioksidan bileşiklerin emülsiyon/lipozom gibi sistemlerle taşınmasında kullanılabileceği belirlenmiştir. Hidrolizattan üretilen düşük molekül ağırlıklı peptitlerin ise, fermente et ürünlerinde yeni peptit oluşumunu teşvik ederken ürün kalitesini de olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyonda (%1) peptit ilave edilen sucukta 102 gün boyunca K'den daha yüksek antioksidan aktivite belirlenmiş olması fonksiyonel et ürünü üretimi için atılmış önemli bir adımdır. İlave edilen peptitlerin gastrointestinal sindirimi sonrasında biyoaktif özelliklerinin korunabilmesi durumunda gelecekte besleyici değeri artırılmış ve potansiyel sağlık üzerine olumlu etkileri olan sucuk üretiminin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adesogan, A. T., Havelaar, A. H., McKune, S. L., Eilittä, M. and Dahl, G. E. 2020. Animal source foods: Sustainability problem or malnutrition and sustainability solution. Perspective matters. *Global Food Security*, 25; 100325.
- Ahn D. U., Olson D. G., Jo C., Chen X., Wu C. and Lee J I. 1998. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties, *Meat Science*, 47(1); 27-39.
- Alao, B. O., Falowo, A. B., Chulayo, A. and Muchenje, V. 2017. The potential of animal by-products in food systems: Production, prospects and challenges. *Sustainability*, 9(7); 1089.
- Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., della Malva, A. and Marino, R. 2017. Bioactive Peptides in Animal Food Products. *Foods*, 6(5); 35.
- Alfaia, C. M., Gouveia, I. M., Fernandes, M. H., Fernandes, M. J., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto, A. S. and Fraqueza, M. J. 2018. Assessment of Coagulase-Negative Staphylococci and Lactic Acid Bacteria Isolated from Portuguese Dry Fermented Sausages as Potential Starters Based on Their Biogenic Amine Profile. *Journal of Food Science*, 83(10); 2544–2549.
- AOAC 1998. *Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed, A.O.A.C. International, Gaithersburg, MD.
- AOAC. 2010. *Official Methods of Analysis* (17th edition). Sec #928.08. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Ashaolu, T. J., Khalifa, I., Mesak, M. A., Lorenzo, J. M. and Farag, M. A. 2021. A comprehensive review of the role of microorganisms on texture change, flavor and biogenic amines formation in fermented meat with their action mechanisms and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(19); 3538-3555.
- Ashaolu, T. J., Le, T. D. and Suttikhana, I. 2023. Stability and bioactivity of peptides in food matrices based on processing conditions. *Food Research International*, 112786.
- Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S. B., Altintzoglou, T., Wubshet, S. G., Gildberg, A., Afseth, N. K., Whitaker, R. D. and Lindberg, D. 2018. Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. *Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*, 123–150.
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A. and McConnell, M. A. 2013. Slaughterhouse blood: An emerging source of bioactive compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3); 314–331.
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A. and McConnell, M. A. 2015. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and

- fungal protease preparations. *Food Chemistry*, 176, 54–63.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.025>
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M. A. and Carne, A. 2016. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chemistry*, 213; 98–107.
- Baindara, P., Korpole, S. and Grover, V. 2018. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24); 10393–10408.
- Baldi, A. and Gottardo, D. 2017. Livestock production to feed the planet: Animal protein: A forecast of global demand over the next years. *Rel.: Beyond Anthropocentrism*, 5; 65.
- Barrón-Ayala, C. G., Valenzuela-Melendres, M., Camou, J. P., Sebranek, J. G., Dávila-Ramírez, J. L. and Cumplido-Barbeitia, G. 2020. Pork frankfurters prepared with hydrolyzed whey: Preliminary product quality aspects and inhibitory activity of the resulting peptides on angiotensin-converting enzyme. *Meat Science*, 166; 108–111
- Bechaux, J., Gatellier, P., Le Page, J. F., Drillet, Y. and Sante-Lhoutellier, V. 2019. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food and Function*, 10(10); 6244–6266.
- Bechinger, B. 2009. Rationalizing the membrane interactions of cationic amphipathic antimicrobial peptides by their molecular shape. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(5); 349–355).
- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H. and Genot, C. 2014. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5); 945–977.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R. and Kumar, V. 2020. A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1); 139–150.
- Bhat, Z. F., Kumar, S. and Bhat, H. F. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9); 5377–5392.
- Borrajo, P., Pateiro, M., Gagaoua, M., Franco, D., Zhang, W. and Lorenzo, J. M. 2020. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of porcine liver protein hydrolysates obtained using Alcalase, Bromelain, and Papain. *Applied Sciences*, 10(7); 22–90.
- Bougatef, H., Krichen, F., Kobbi, S., Martinez-Alvarez, O., Nedjar, N., Bougatef, A. and Sila, A. 2018. Physicochemical and Biological Properties of Eel By-Products Protein Hydrolysates: Potential Application to Meat Product Preservation. *Waste and Biomass Valorization*, 11; 931–942.

- Bradford, M. 1970. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein dye banding. *Annals of Biochemistry*, 72; 248–254.
- Candogan, K., Wardlaw, F. B. and Acton, J. C. 2009. Effect of starter culture on proteolytic changes during processing of fermented beef sausages. *Food Chemistry*, 116(3); 731–737.
- Carballo, J. 2021. Sausages: Nutrition, Safety, Processing and Quality Improvement. *Foods*, 10(4); 890.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D. and Villani, F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*, 25(2); 335–347.
- Castellano, P., Ibarreche, M. P., Massani, M. B., Fontana, C. and Vignolo, G. M. 2017. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: A focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*, 5(3); 38.
- Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L. and Prentice, C. 2014. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(6); 2877–2893.
- Chakka, A. K., Elias, M., Jini, R., Sakhare, P. Z. and Bhaskar, N. 2015. In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12); 8059–8067.
- Chen, D., Chen, W., Li, W., Wen, X., Wu, D., Zhang, Z. and Yang, Y. 2023. Effects of continuous enzymolysis on the umami characteristics of *Lentinula edodes* and the flavor formation mechanism of umami peptides. *Food Chemistry*, 420; 136090.
- Cheng, Q. and Sun, D. W. 2008. Factors affecting the water holding capacity of red meat products: A review of recent research advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2); 137–159.
- Chou, S., Wang, J., Shang, L., Akhtar, M. U., Wang, Z., Shi, B., Feng, X. and Shan, A. 2019. Short, symmetric-helical peptides have narrow-spectrum activity with low resistance potential and high selectivity. *Biomaterials Science*, 7(6); 2394–2409.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthalaldehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6); 1219–1227.
- Colovic, M. B., Vasic, V. M., Djuric, D. M., and Krstic, D. Z. 2018. Sulphur-containing Amino Acids: Protective Role Against Free Radicals and Heavy Metals. *Current Medicinal Chemistry*, 25(3); 324–335.

- Cournoyer, A., Thibodeau, J., Ben Said, L., Sanchez-Reinoso, Z., Mikhaylin, S., Fliss, I., and Bazinet, L. 2022. How Discoloration of Porcine Cruor Hydrolysate Allowed the Identification of New Antifungal Peptides. *Foods*, 11(24); 4035.
- Cruxen, C. E. dos S., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Haubert, L., Marques, J. de L., Kroning, I. S., Chaves, F. C., da Silva, W. P. and Fiorentini, Á. M. 2017. Characterization of *Staphylococcus xylosus* LQ3 and its application in dried cured sausage. *LWT*, 86; 538–543.
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L. and Flores-Gallegos, A. C. 2021. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3; 100047.
- Cui, Q., Sun, Y., Zhou, Z., Cheng, J. and Guo, M. 2021. Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties and solubility and bitterness of milk protein hydrolysates. *Foods*, 10(10); 2462.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1); 144–148.
- Daliri, E., Oh, D. and Lee, B. 2017. Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5); 32.
- Dalmış, Ü. and Soyer, A. 2008. Effect of processing methods and starter culture (*Staphylococcus xylosus* and *Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage. *Meat Science*, 80(2); 345–354.
- Damgaard, T. D., Otte, J. A. H., Meinert, L., Jensen, K. and Lametsch, R. 2014. Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. *Food Science and Nutrition*, 2(3); 282–288.
- Damgaard, T., Lametsch, R. and Otte, J. 2015. Antioxidant capacity of hydrolyzed animal by-products and relation to amino acid composition and peptide size distribution. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10); 6511–6519.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N. E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. 2005. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26(5); 713–719.
- Day, L. 2013. Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science and Technology*, 32(1); 25–42.
- de Araújo, P. D., Araújo, W. M. C., Patarata, L. and Fraqueza, M. J. 2022. Understanding the main factors that influence consumer quality perception and attitude towards meat and processed meat products. *Meat Science*, 193; 108952.
- Demirok Soncu, E., Özdemir, N., Arslan, B., Küçükkaya, S. and Soyer, A. 2020. Contribution of surface application of chitosan–thyme and chitosan–rosemary essential oils to the volatile composition, microbial profile, and physicochemical and

- sensory quality of dry-fermented sausages during storage. *Meat Science*, 166; 108127
- Deniz, E., Mora, L., Aristoy, M. C., Candoğan, K. and Toldrá, F. 2016. Free amino acids and bioactive peptides profile of Pastırma during its processing. *Food Research International*, 89; 194-201.
- Descalzo, A. M. and Sancho, A. M. 2008. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3); 423-436.
- Di Bernardini, R., Rai, D. K., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., Harnedy, P. and Hayes, M. 2011. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. *Peptides*, 32(2); 388–400.
- Dong, X. H., Li, J., Jiang, G. X., Li, H. Y., Zhao, M. M. and Jiang, Y. M. 2019. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on physicochemical and antioxidant properties of peanut proteins. *Food Science & Nutrition*, 7(4); 1417-1425.
- Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Aarestrup, F. M. and Hansen, E. B. 2015. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic Bacteria. *PLoS ONE*, 10(12); e0144611.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5); 430–441.
- El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A. A., Al-Sultan, S. I., El-Ghareeb, W. R., Hussein, E. O. S., Ba-Awad, H. A., Akl, B. A. and Nader, M. M. 2021. Enhancing quality and safety of raw buffalo meat using the bioactive peptides of pea and red kidney bean under refrigeration conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1); 762–776.
- Ennaas, N., Hammami, R., Beaulieu, L. and Fliss, I. 2015. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3); 195–200.
- Escudero, E., Aristoy, M. C., Nishimura, H., Arihara, K. and Toldrá, F. 2012. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 91(3); 306–311.
- Eymard, S., Baron, C. P. and Jacobsen, C. 2009. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*, 114(1); 57–65.

- Fadda, S., López, C. and Vignolo, G. 2010. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, 86(1); 66–79.
- Favaro, L. and Todorov, S. D. 2017. Bacteriocinogenic LAB Strains for Fermented Meat Preservation: Perspectives, Challenges, and Limitations. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(4); 444–458.
- Feng, L., Qiao, Y., Zou, Y., Huang, M., Kang, Z. and Zhou, G. 2014. Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant capacity and sensory attributes of Chinese sausage. *Meat Science*, 98(1); 34–40.
- Foegeding, E. A. and Davis, J. P. 2011. Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8); 1853–1864.
- Fu, Y., Liu, J., Hansen, E. T., Bredie, W. L. P. and Lametsch, R. 2018. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. *Food Chemistry*, 257; 163–171.
- Fu, Y., Young, J. F. and Therkildsen, M. 2017. Bioactive peptides in beef: Endogenous generation through postmortem aging. *Meat Science*, 123; 134–142.
- Gallego, M., Mora, L., Escudero, E. and Toldrá, F. 2018. Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 276(April); 71–78.
- Ge, Y., Sun, A., Ni, Y. and Cai, T. 2000. Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12); 6215–6218.
- Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlouf, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A. and Besbes, S. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*, 12; 516–525.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2011. In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3); 381–389.
- Gohi, B. F. C. A., Du, J., Zeng, H. Y., Cao, X. J. and Zou, K. M. 2019. Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the lotus seed protein. *Bioengineering*, 6(2); 28.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. 1949. *J. Biol. Chem.* 177; 751-766
- Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A. D. and Jacobsen, C. 2018. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18); 3097–3129.

- Halagarda, M., and Wójciak, K. M. 2022. Health and safety aspects of traditional European meat products. A review. *Meat Science*, 184; 108623.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M. and Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1); 23–35.
- Huang, L., Feng, M. Q. and Sun, J. 2022. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from fermented sausages inoculated with *Lactobacillus plantarum* CD101 and *Staphylococcus simulans* NJ201. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(8); 4985–4997.
- Hübel, C. and Schaltegger, S. 2022. Barriers to a sustainability transformation of meat production practices - An industry actor perspective. *Sustainable Production and Consumption*, 29; 128–140.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1); 178–184.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. and Bawa, A. S. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3); 278–293.
- Ji, D., Udenigwe, C. C. and Agyei, D. 2019. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: An in silico assessment. *Food Science and Human Wellness*, 8(3); 306–314.
- Jia, X. Y., Zhu, M. F., Zhang, L., Ma, T. X., Li, Y. H., Sheng, W. S. and Tu, Z. C. 2022. Extraction optimization and screening of antioxidant peptides from grass carp meat and synergistic–antagonistic effect. *Food Science and Nutrition*, 10(5); 1481–1493.
- Jiang, J. and Xiong, Y. L. 2016. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120; 107–117.
- Kaban, G. 2013. Sucuk and pasti{dotless}rma: Microbiological changes and formation of volatile compounds. *Meat Science*, 95(4); 912–918.
- Kaban, G. and Kaya, M. 2008. Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (Sucuk). *Journal of Food Science*, 73(8); 385–388.
- Karami, Z. and Akbari-adergani, B. (019. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2); 535–547.
- Kaya, M. ve Kaban, G. 2016. Gıda Biyoteknolojisi. Ed. N. Aran. Nobel akademik yayıncılık (5th Ed.). Ankara.

- Kęska, P., Stadnik, J., Kononiuk, A., Libera, J. and Wójciak, K. M. 2018. Bioactive peptides from meat industry by-products as potential antimicrobial agents based on BIOPEP-UWM database. *Biotechnology and Food Science*, 82(2); 75–84.
- Khan, F., Niaz, K. and Abdollahi, M. 2018. Toxicity of Biologically Active Peptides and Future Safety Aspects: An Update. *Current Drug Discovery Technologies*, 15(3); 236–242.
- Khusro, A. and Aarti, C. 2022. Metabolic heterogeneity and techno-functional attributes of fermented foods-associated coagulase-negative staphylococci. *Food Microbiology*, 105; 104028.
- Kiokias, S. N., Dimakou, C. P., Tsaprouni, I. V. and Oreopoulou, V. 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophysics*, 1(3); 115–123.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4); 1317–1327.
- Kong, B. and Xiong, Y. L. 2006. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16); 6059–6068.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9); 945–960.
- Lafarga, T., Álvarez, C. and Hayes, M. 2017. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6); 1–18.
- Lafarga, T. and Hayes, M. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 98(2); 227–239.
- Lafarga, T. and Hayes, M. 2017. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33(3); 217–246.
- Lambrecht, M. A., Rombouts, I., De Ketelaere, B. and Delcour, J. A. 2017. Prediction of heat-induced polymerization of different globular food proteins in mixtures with wheat gluten. *Food Chemistry*, 221; 1158–1167.
- Lei, J., Gao, Y., Ma, Y., Zhao, K. and Du, F. 2019. Improving the emulsion stability by regulation of dilational rheology properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 583; 123906.
- León Madrazo, A. and Segura Campos, M. R. 2020. Review of antimicrobial peptides as promoters of food safety: Limitations and possibilities within the food industry. In *Journal of Food Safety*, 40(6); e12854.

- Leroy, F., Geyzen, A., Janssens, M., De Vuyst, L. and Scholliers, P. 2013. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. In *Trends in Food Science and Technology*, 31(2); 130–137.
- Li, M., Yu, Z., Wang, Z., Li, X., Liu, B. and Chen, F. Characteristics of the enzyme-induced release of bitter peptides from wheat gluten hydrolysates. *Frontiers in Nutrition*, 9; 1022257.
- Li, R. and Xiong, Y. L. 2021. Ultrasound-induced structural modification and thermal properties of oat protein. *LWT*, 149; 111861;
- Li, Y. and Yu, J. 2015. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of Medicinal Food*, 18(2); 147–156.
- Liang, X., Yang, H., Sun, J., Cheng, J., Luo, X., Wang, Z., Yang, M., Bing Tao, D., Yue, X. and Zheng, Y. 2021. Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk. *Food Science and Nutrition*, 9(2); 985–993.
- Limeneh, D. Y., Tesfaye, T., Ayele, M., Husien, N. M., Ferede, E., Haile, A., Mengie, W., Abuhay, A., Gelebo, G. G., Gibril, M. and Kong, F. 2022. A Comprehensive Review on Utilization of Slaughterhouse By-Product: Current Status and Prospect. *Sustainability (Switzerland)*, 14(11); 6469.
- Liu, H., Li, Y., Diao, X., Kong, B. and Liu, Q. 2018. Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538; 757–764.
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G. H. and Zhang, W. G. 2016. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants*, 5(3); 32.
- Liu, Y., Du, Q., Ma, C., Xi, X., Wang, L., Zhou, M., Burrows, J. F., Chen, T. and Wang, H. 2019. Structure–activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin-PHa: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities. *Drug Design, Development and Therapy*, 13; 447–458.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C. and Toldrá, F. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79(July); 136–147.
- Luan, X., Feng, M. and Sun, J. 2020. Stability of Antioxidant Peptides Extracted from Fermented Sausages. *Shipin Kexue/Food Science*, 41(16); 1–7.
- Maestri, E., Pavlicevic, M., Montorsi, M. and Marmiroli, N. 2019. Meta-Analysis for Correlating Structure of Bioactive Peptides in Foods of Animal Origin with Regard to Effect and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1); 3–30.

- Manzoor, M., Singh, J. and Gani, A. 2022. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. In *Food Chemistry*, 373; 131395.
- Martinez, F. G., Ambrosi, V. A., Rocha, G., Sancho, A. M. and Szerman, N. 2023. Enzymatic hydrolysis as a valorization strategy of bovine lungs: Optimization of process variables and study of antioxidant capacity. *JSFA Reports*, 3(4); 161–169.
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S. and Brenes, A. 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73(1069); 204–212.
- Mennella, C., Visciano, M., Napolitano, A., del Castillo, M. D. and Fogliano, V. 2006. Glycation of lysine-containing dipeptides. *Journal of Peptide Science*, 12(4); 291–296.
- Mirzapour-Kouhdasht, A., McClements, D. J., Taghizadeh, M. S., Niazi, A. and Garcia-Vaquero, M. 2023. Strategies for oral delivery of bioactive peptides with focus on debittering and masking. In *npj Science of Food*, 7(1).
- Mohan, A., Udechukwu, M. C., Rajendran, S. R. C. K. and Udenigwe, C. C. 2015. Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Advances*, 5(118); 97400–97407.
- Mora, L., Escudero, E., Aristoy, M. C. and Toldrá, F. 2015. A peptidomic approach to study the contribution of added casein proteins to the peptide profile in Spanish dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212; 41–48.
- Mora, L., Escudero, E. and Toldrá, F. 2016. Characterization of the peptide profile in Spanish Teruel, Italian Parma and Belgian dry-cured hams and its potential bioactivity. *Food Research International*, 89; 638–646.
- Mora, L., Gallego, M. and Toldrá, F. 2018. ACEI-inhibitory peptides naturally generated in meat and meat products and their health relevance. *Nutrients*, 10(9); 1–12.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F. and Bramley, P. M. 2009. Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8); 3228–3234.
- Mwangi, W. W., Lim, H. P., Low, L. E., Tey, B. T. and Chan, E. S. 2020. Food-grade Pickering emulsions for encapsulation and delivery of bioactives. In *Trends in Food Science and Technology*, 100; 320–332.
- Najafian, L. and Babji, A. S. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1); 178–185.
- Najafian, L. and Babji, A. S. 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrollysate. *Journal of Functional Foods*, 9(1); 280–289.

- Nielsen, P. M., Petersen, D. and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5); 642–646.
- Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y. L., Álvarez, D., Payne, F. A. and Garrido, M. D. 2009. Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Science*, 83(1); 24–30.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M. and De La Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4); 329–367.
- Ovando, C. A., Carvalho, J. C. de, Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T. and Soccol, C. R. 2018. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina*: A review. In *Food Reviews International*, 34(1); 34–51.
- Penã-Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties, *Meat Science*, 64(3); 259-263
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8); 4712–4718.
- Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P. and Nedjar, N. 2016. Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211; 306–313.
- Rahman, U. ur, Sahar, A. and Khan, M. A. 2014. Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. *Food Research International*, 65; 322–328.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D. and Dhulster, P. 2018. Production of bioactive peptides by lactobacillus species: From gene to application. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT); 2354.
- Rawdkuen, S., Jaimakreu, M. and Benjakul, S. 2013. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. *Food Chemistry*, 136(2); 909–916.
- Ribeiro, F. A., Lau, S. K., Pflanzner, S. B., Subbiah, J. and Calkins, C. R. 2021. Color and lipid stability of dry aged beef during retail display. *Meat Science*, 171; 108274.
- Rizzetti, T. M., de Souza, M. P., Prestes, O. D., Adaime, M. B. and Zanella, R. 2017. A Simple and Fast Method for the Determination of 20 Veterinary Drug Residues in Bovine Kidney and Liver by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10(4); 854–864.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2011. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients*, 3(9); 765–791.
- Ryan, M.T. and Chopra, R.K. 1976 *Biochim. Biophys. Acta* 427; 337-349

- Ryder, K., Bekhit, A. E. D., McConnell, M. and Carne, A. 2016. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208; 42–50.
- Sabeena Farvin, K. H., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J. and Jacobsen, C. 2010. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 - Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123(4); 1090–1097.
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O. N. 2018. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5); 726–740.
- Samaranayaka, A. G. P. and Li-Chan, E. C. Y. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4); 229–254.
- Sarmadi, B. H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10); 1949–1956.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. and Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12); 400–421.
- Shahidi, F. and Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*, 91(4); 914–931
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K. and Kulshrestha, S. 2020. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, 6(4); 106.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y. and Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2); 929–938.
- Sila, A. and Bougatef, A. 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21; 10–26.
- Sohaib, M., Anjum, F. M., Sahar, A., Arshad, M. S., Rahman, U. U., Imran, A. and Hussain, S. 2017. Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A comprehensive review. *International Journal of Food Properties*, 20(11); 2581–2593.
- Song, R., Wei, R. B., Luo, H. Y. and Wang, D. F. 2012. Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *Molecules*, 17(3); 2980–2991.
- Soyer, A., Ertaş, A. H. and Üzümcüoğlu, Ü. 2005. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Science*, 69(1); 135–141.

- Soyer, A. and Ertas, A. H. 2007. Effects of fat level and storage time on lipid and color stability of naturally fermented Turkish sausages (Sucuk). *Journal of Muscle Foods*, 18(3); 330-340.
- Spellman, D., O’Cuinn, G. and FitzGerald, R. J. 2009. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*, 114(2); 440–446.
- Sun, C., Shan, Y., Tang, X., Han, D., Wu, X., Wu, H. and Hosseininezhad, M. 2021. Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical property and antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein. *Food Science and Nutrition*, 9(10); 5379–5390.
- Sun, Q., Chen, Q., Li, F., Zheng, D. and Kong, B. 2016. Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 68; 358–366.
- Sun, W., Zhao, H., Zhao, Q., Zhao, M., Yang, B., Wu, N. and Qian, Y. 2009. Structural characteristics of peptides extracted from Cantonese sausage during drying and their antioxidant activities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4); 558–563.
- Sun, X. D. and Arntfield, S. D. 2012. Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: Effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. *Food Hydrocolloids*, 28(2); 325–332.
- Sun, X. and Udenigwe, C. C. 2020. Chemistry and Biofunctional Significance of Bioactive Peptide Interactions with Food and Gut Components. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46); 12972–12977.
- Tamang, N., Shrestha, P., Khadka, B., Mondal, M. H., Saha, B. and Bhattarai, A. 2022. A review of biopolymers’ utility as emulsion stabilizers. *Polymers*, 14(1); 127.
- Tavano, O. L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90; 1–11.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Mora, L. and Reig, M. 2012. Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92(3); 290–296.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C. and Mora, L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267; 395–404.
- ToldraÂ, F., Aristoy, M.-C., & nica Flores, M. 2000. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33(3-4), 181-185.
- Tomović, V., Šojić, B., Savanović, J., Kocić-Tanackov, S., Pavlić, B., Jokanović, M. and Vujadinović, D. 2020. New formulation towards healthier meat products: *Juniperus communis* L. essential oil as alternative for sodium nitrite in dry fermented sausages. *Foods*, 9(8); 1066.

- Turesky, R. J. 2018. Mechanistic evidence for red meat and processed meat intake and cancer risk: A follow-up on the international agency for research on cancer evaluation of 2015. *Chimia*, 72(10); 718–724.
- Udenigwe, C. C., Abioye, R. O., Okagu, I. U. and Obeme-Nmom, J. I. 2021. Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. In *Current Opinion in Food Science*, 39; 182–189.
- Udenigwe, C. C. and Fogliano, V. 2017. Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35; 9–12.
- Van Lancker, F., Adams, A. and De Kimpe, N. 2011. Chemical modifications of peptides and their impact on food properties. *Chemical Reviews*, 111(12); 7876–7903.
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Petrović, L. and Peričin, D. 2010. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity in the water-soluble protein extract from Petrovac Sausage (Petrovska Kolbasa). *Food Control*, 21(9); 1298–1302.
- Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P. and Mehta, N. 2022. Assessment of quality attributes of porcine blood and liver hydrolysates incorporated pork loaves stored under aerobic and modified atmospheric packaging. *Journal of Food Science and Technology*, 59(3); 1114–1130.
- Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P. A. V. A. N. and Mehta, N. 2017. Antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysate extracted from porcine liver. *Indian J. Anim. Sci*, 87; 711–717.
- Wang, D., Wang, L. jun, Zhu, F. xue, Zhu, J. ye, Chen, X. D., Zou, L., Saito, M. and Li, L. te. 2008. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, 107(4); 1421–1428.
- Wang, H., Wang, Q., Xia, X., Sun, F. and Kong, B. 2021. Biochemical properties of extracellular protease from *Staphylococcus carnosus* RT6 isolated from Harbin dry sausages, and its hydrolysis of meat proteins. *Journal of Food Science*, 86(5); 1642–1655.
- Wang, L. L. and Xiong, Y. L. 2005. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23); 9186–9192.
- Wang, P., Zhang, J., Tang, Y., Zhang, Z., Zhang, Y. and Hu, J. 2021. Purification and characterization of antioxidant peptides from hairtail surimi hydrolysates and their effects on beef color stability. *Journal of Food Science*, 86(7); 2898–2909.
- Wang, S., Lin, J., Ye, M., Ng, T. B., Rao, P. and Ye, X. 2006. Isolation and characterization of a novel mung bean protease inhibitor with antipathogenic and anti-proliferative activities. *Peptides*, 27(12); 3129–3136.

- Wei, J. T. and Chiang, B. H. 2009. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(3); 372–378.
- Wen, C., Zhang, J., Zhou, J., Cai, M., Duan, Y., Zhang, H. and Ma, H. 2020. Antioxidant activity of arrowhead protein hydrolysates produced by a novel multi-frequency S-type ultrasound-assisted enzymolysis. *Natural Product Research*, 34(20); 3000–3003.
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J. A. 2016. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4); 786–800.
- Xiong, Y. L. 2018. Muscle proteins. In *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing, 127-148.
- Xu, D., Wang, R., Xu, Z., Xu, Z., Li, S., Wang, M., Feng, X. and Xu, H. 2019. Discovery of a Short-Chain ϵ -Poly-L-lysine and Its Highly Efficient Production via Synthetase Swap Strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(5); 1453–1462.
- Yan, X., Yang, L., Zhang, Y., Han, W. and Duan, Y. 2022. Effect of collagen casing on the quality characteristics of fermented sausage. *Plos one*, 17(2); e0263389.
- Yang, F. J., Chen, X., Huang, M. C., Yang, Q., Cai, X. X., Chen, X., Du, M., Huang, J. L. and Wang, S. Y. 2021. Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9); 2313–2332.
- Yang, J., Huang, J., Zhu, Z. and Huang, M. 2020. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: response surface methodology. *Poultry Science*, 99(12); 7159–7168.
- Yang, J. and Xiong, Y. L. 2018. Comparative time-course of lipid and myofibrillar protein oxidation in different biphasic systems under hydroxyl radical stress. *Food Chemistry*, 243; 231–238.
- Yang, R., Li, X., Lin, S., Zhang, Z. and Chen, F. 2017. Identification of novel peptides from 3 to 10 kDa pine nut (*Pinus koraiensis*) meal protein, with an exploration of the relationship between their antioxidant activities and secondary structure. *Food Chemistry*, 219; 311–320.
- Ye, A. and Singh, H. 2007. Formation of multilayers at the interface of oil-in-water emulsion via interactions between lactoferrin and β -lactoglobulin. *Food Biophysics*, 2(4); 125–132.
- Yekta, M. M., Rezaei, M., Nouri, L., Azizi, M. H., Jabbari, M., Eş, I. and Khaneghah, A. M. 2020. Antimicrobial and antioxidant properties of burgers with quinoa peptide-loaded nanoliposomes. *Journal of Food Safety*, 40(2).

- Yin, Y., Zhou, L., Pereira, J., Zhang, J. and Zhang, W. 2020. Insights into Digestibility and Peptide Profiling of Beef Muscle Proteins with Different Cooking Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(48); 14243–14251.
- Yu, D., Feng, M. Q. and Sun, J. 2021. Influence of mixed starters on the degradation of proteins and the formation of peptides with antioxidant activities in dry fermented sausages. *Food Control*, 123; 107743.
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G. And Trziszka, T. 2013. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44(2); 315–320.
- Zanutto-Elgui, M. R., Vieira, J. C. S., Prado, D. Z. do, Buzalaf, M. A. R., Padilha, P. de M., Elgui de Oliveira, D. and Fleuri, L. F. 2019. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*, 278; 823–831.
- Zhang, L., Li, J. and Zhou, K. 2010. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, 101(7); 2084–2089.
- Zhao, Q., Selomulya, C., Wang, S., Xiong, H., Chen, X. D., Li, W., Peng, H., Xie, J., Sun, W. and Zhou, Q. 2012. Enhancing the oxidative stability of food emulsions with rice dreg protein hydrolysate. *Food Research International*, 48(2); 876–884.
- Zheng, X. Q., Wang, J. T., Liu, X. L., Sun, Y., Zheng, Y. J., Wang, X. J. and Liu, Y. 2015. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry*, 172; 407–415.
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W. and Xia, E. Q. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1); 72.

EKLER

EK 1 Çiğ sucuk duyusal değerlendirme formu

EK2 Pişmiş sucuk duyusal değerlendirme formu

EK 3 Sucuktan elde edilen peptit ekstraktlarının ABTS, FRAP ve peptit konsantrasyonu sonuçlarına ait veriler

EK 4 Araştırma verilerinin varyans analiz sonuçları

EK 1 Çiğ Sucuk Duyusal Değerlendirme Formu

Panelistin Adı Soyadı:

Tarih:

*Formu doldurmadan önce lütfen dikkatlice okuyunuz.

1) Koku

Açıklama: Kapaklı kaplarda bulunan sucuk dilimlerini, kapakları açar açmaz koklayarak, hissinizi hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

**Örnekler arasında, su ya da kahve koklayarak, burnunuzda bir önceki kokunun etkisini nötürleyebilirsiniz.

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

	Çok kötü										Çok iyi
801	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
764	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
272	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
362	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
138	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

2) Renk

Açıklama: Örneklerin kesit yüzey renklerini bir arada değerlendiriniz. Tipik doğal sucuk rengini dikkate alarak, hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

	Çok kötü	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Çok iyi
801												
764												
272												
362												
138												

3) Tat/lezzet

Açıklama: Sucuk dilimini yeterli düzeyde ısırarak, arka dişlerle iyice çiğneyiniz. Yuttuktan (veya yutmadan ağızdan çıkarttıktan) sonra algılanan tipik sucuk tadını (asidik ve baharatsı tat) hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

****Örnekler arasında, ağzınızdaki bir önceki tadın etkisini gidermek için bir parça galeta ve sudan yararlanınız.**

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

Çok kötü

Çok iyi

A number line from 1 to 10. A box labeled '801' is positioned above the number 1. The area under the number line from 1 to 10 is shaded with diagonal lines.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn above the tick mark for 1, containing the number 764.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 362.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box containing the number 138 is positioned above the tick mark for 1.

4) Tekstür

Açıklama: Size verilen ürünlerin dokusu hakkındaki hissinizi en iyi tanımlayan hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X). Arka dişlerle iyice çiğnenen küçük bir parça sucuk diliminin dişlere gösterdiği direnç tekstür olarak değerlendirilecektir. Örnekler arasında, ağızınızdaki bir önceki tadın etkisini gidermek için bir parça galeta ve sudan yararlanınız.

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

Çok kötü

Çok iyi

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box containing the number 801 is positioned above the tick mark for 1.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 764.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 272.

A horizontal number line is shown with tick marks labeled from 1 to 10. A rectangular box is drawn around the tick mark for the number 1. The number 362 is written inside this box.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 138.

5) Genel beğeni

Açıklama: Size ürünleri kendi aralarında beğeni durumunuza göre hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

	Çok kötü																			Çok iyi
801	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
764	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
272	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
362	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
138	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										

GENEL NOTLAR:

121

2) Renk

Açıklama: Örneklerin kesit yüzey renklerini bir arada değerlendiriniz. Tipik doğal sucuk rengini dikkate alarak, hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

Çok kötü

Çok iyi

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn above the tick mark for 1, containing the number 801.

A number line from 1 to 10. A box labeled '764' is positioned above the number 1. Shaded regions are present below the number line between 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, and 9-10.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn above the tick mark for 1, containing the number 272.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 362.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is positioned above the tick mark for 1, containing the number 138.

3) Tat/lezzet

Açıklama: Sucuk dilimini yeterli düzeyde ısırarak, arka dişlerle iyice çiğneyiniz. Yuttuktan (veya yutmadan ağızdan çıkarttıktan) sonra algılanan tipik sucuk tadını (asidik ve baharatsı tat) hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

****Örnekler arasında, ağzınızdaki bir önceki tadın etkisini gidermek için bir parça galeta ve sudan yararlanınız.**

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

Çok kötü

Çok iyi

A number line from 1 to 10. A box labeled '801' is positioned above the number 1. Shaded regions are present below the number line between 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, and 9-10.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn above the tick mark for 1, containing the number 764.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn around the number 272, which is positioned above the tick mark for 1.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is drawn above the tick mark for 1, containing the number 362.

A horizontal number line with tick marks labeled 1 through 10. A rectangular box is placed above the tick mark for 1, containing the number 138.

4) Tekstür

Açıklama: Size verilen ürünlerin dokusu hakkındaki hissinizi en iyi tanımlayan hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X). Arka dişlerle iyice çiğnenen küçük bir parça sucuk diliminin dişlere gösterdiği direnç tekstür olarak değerlendirilecektir. Örnekler arasında, ağızınızdaki bir önceki tadın etkisini gidermek için bir parça galeta ve sudan yararlanınız.

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

	Çok kötü											Çok iyi
801	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
764	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
272	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
362	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
138	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

5) Genel beğeni

Açıklama: Size ürünleri kendi aralarında beğeni durumunuza göre hedonik ölçek üzerinde işaretleyiniz (X).

1: Çok kötü , 2: bayağı kötü, 3: kötü, 4: biraz kötü, 5: nötr, 6: biraz iyi, 7: orta iyi, 8: iyi, 9: oldukça iyi, 10:çok iyi

Örnek no

	Çok kötü																			Çok iyi
801	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
764	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
272	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
362	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
138	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										

GENEL NOTLAR:

EK 3 Sucuktan elde edilen peptit ekstraktlarının ABTS, FRAP ve peptit konsantrasyonu sonuçlarına ait veriler

ABTS						
Uygulama	Süre (gün)					
	0	6	12	42	72	102
K	0,15±0,01 ^{Bb}	0,27±0,01 ^{Ab}	0,25±0,04 ^{Ab}	0,25±0,03 ^{Ac}	0,22±0,02 ^{Ab}	0,23±0,01 ^{Ac}
3P1	0,29±0,01 ^{Ba}	0,38±0,05 ^{Aab}	0,33±0,02 ^{Aba}	0,34±0,03 ^{Aba}	0,38±0,02 ^{Aa}	0,40±0,00 ^{Ab}
3P2	0,27±0,03 ^{Ba}	0,41±0,09 ^{Aa}	0,34±0,02 ^{Aa}	0,37±0,03 ^{Aa}	0,40±0,09 ^{Aa}	0,37±0,01 ^{Ab}
10P1	0,25±0,04 ^{Ba}	0,39±0,03 ^{Aab}	0,35±0,03 ^{Aa}	0,35±0,03 ^{Aa}	0,40±0,06 ^{Aa}	0,37±0,03 ^{Ab}
10P2	0,29±0,04 ^{Ca}	0,38±0,02 ^{Bab}	0,38±0,02 ^{Ba}	0,42±0,02 ^{Ba}	0,45±0,07 ^{ABa}	0,53±0,03 ^{Aa}
FRAP						
Uygulama	Süre (gün)					
	0	6	12	42	72	102
K	0,13±0,00 ^{Ab}	0,16±0,01 ^{Aa}	0,13±0,00 ^{Aa}	0,13±0,01 ^{Aa}	0,16±0,03 ^{Aa}	0,12±0,02 ^{Aa}
3P1	0,17±0,00 ^{Aab}	0,19±0,02 ^{Aa}	0,17±0,02 ^{Aa}	0,17±0,02 ^{Aa}	0,17±0,03 ^{Aa}	0,17±0,00 ^{Aa}
3P2	0,16±0,00 ^{Aab}	0,20±0,02 ^{Aa}	0,18±0,02 ^{Aa}	0,19±0,02 ^{Aa}	0,18±0,03 ^{Aa}	0,15±0,01 ^{Aa}
10P1	0,19±0,00 ^{ABab}	0,21±0,02 ^{Aa}	0,17±0,02 ^{Aba}	0,18±0,02 ^{Aba}	0,20±0,02 ^{Aba}	0,17±0,00 ^{Ba}
10P2	0,19±0,00 ^{Aa}	0,22±0,01 ^{Aa}	0,18±0,02 ^{Aa}	0,19±0,02 ^{Aa}	0,23±0,00 ^{Aa}	0,19±0,00 ^{Aa}
Peptit Konsantrasyonu						
Uygulama	Süre (gün)					
	0	6	12	42	72	102
K	1,82±0,02 ^{Db}	2,11±0,02 ^{Cc}	2,15±0,02 ^{Cb}	2,24±0,09 ^{Ba}	2,33±0,03 ^{Aa}	2,31±0,02 ^{ABc}
3P1	1,90±0,01 ^{Cab}	2,20±0,04 ^{Bbc}	2,27±0,11 ^{ABab}	2,26±0,05 ^{Aba}	2,38±0,03 ^{Aa}	2,36±0,03 ^{Abc}
3P2	2,00±0,06 ^{Ca}	2,24±0,03 ^{Bab}	2,31±0,07 ^{Ba}	2,27±0,01 ^{Ba}	2,41±0,00 ^{Aa}	2,34±0,05 ^{Bc}
10P1	1,95±0,06 ^{Ca}	2,25±0,07 ^{Bab}	2,25±0,12 ^{Bab}	2,34±0,01 ^{Aba}	2,36±0,04 ^{Aba}	2,44±0,01 ^{Aab}
10P2	1,98±0,03 ^{Ca}	2,32±0,07 ^{BCa}	2,29±0,05 ^{Ca}	2,32±0,03 ^{BCa}	2,41±0,05 ^{Ba}	2,54±0,02 ^{Aa}

EK 4 Araştırma Verilerinin Varyans Analiz Sonuçları

EK 4.1 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween 20 ve lesitin emülsiyonları ile lipozomda depolama sırasında TBARM miktarında meydana gelen değişmelere uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	2678.24	0.001
Olgunlaşma süresi(S)	2	1123.20	0.001
SxM	6	422.26	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		
Lesitin			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	730.99	0.001
Olgunlaşma süresi(S)	2	382.96	0.001
SxM	6	261.08	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		
Lipozom			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	293.95	0.001
Olgunlaşma süresi(S)	2	29.172	0.006
SxM	6	7.728	0.007**
Hata	25		
Toplam	54		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.2 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween 20 ve lesitin emülsiyonları ile lipozomda depolama sırasında konjuge dien miktarında meydana gelen değişmelere uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	6.752	0.060
Depolama süresi(S)	2	14.227	0.002
SxM	6	10.327	0.002**
Hata	8		
Toplam	19		
Lesitin			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	82.254	0.001
Depolama süresi(S)	2	289.000	0.001
SxM	6	31.057	0.001**
Hata	8		
Toplam	19		
Lipozom			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	5.798	0.042
Depolama süresi(S)	2	4.844	0.074
SxM	6	6.051	0.012*
Hata	8		
Toplam	19		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.3 Farklı konsantrasyonlarda sığır karaciğer hidrolizatları içeren Tween 20 ve lesitin emülsiyonları ile lipozomda depolama sırasında partikül boyutunda meydana gelen değişmelere uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	20.77	0.001
Depolama süresi(S)	2	19.93	0.010
SxM	6	33.045	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		
Lesitin			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	143.997	0.001
Depolama süresi(S)	2	113.375	0.001
SxM	6	41.475	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		
Lipozom			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	3	732.896	0.001
Depolama süresi(S)	2	112.008	0.001
SxM	6	35.933	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.4 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların *Enterobacteriaceae* sayıları üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.252	0.902
Üretim süresi(S)	2	340.10	0.000**
SxM	8	0.252	0.975
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.5 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların *Enterobacteriaceae* sayıları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0	-
Depolama süresi(S)	3	0	-
SxM	12	0	-
Hata	15		
Toplam	34		

EK 4.6 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların KNK sayıları üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	1.352	0.368
Üretim süresi(S)	2	1029.56	0.001**
SxM	8	1.161	0.404
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.7 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların KNK sayıları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.523	0.721
Depolama süresi(S)	3	4.187	0.014*
SxM	12	0.048	1.000
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.8 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların TAMB sayıları üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.423	0.789
Üretim süresi(S)	2	23.270	0.001**
SxM	8	0.223	0.982
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.9 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların TAMB sayıları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.354	0.836
Depolama süresi(S)	3	9.197	0.001**
SxM	12	0.168	0.999
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.10 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların LAB sayıları üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.041	0.996
Üretim süresi(S)	2	3.359	0.077
SxM	8	0.120	0.997
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.11 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların LAB sayıları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.060	0.324
Depolama süresi(S)	3	1.208	0.992
SxM	12	0.254	0.992
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.12 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların maya ve küf sayıları üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.132	0.967
Üretim süresi(S)	2	18.625	0.001**
SxM	8	0.415	0.982
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.13 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların maya ve küf sayıları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	370.926	0.735
Depolama süresi(S)	3	3.378	0.031*
SxM	12	0.502	0.897
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.14 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli çiğ sucukların koku puanları üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.502	0.711
Üretim süresi(S)	1	5.133	0.073
SxM	4	0.865	0.543
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.15 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli çiğ sucukların üretim sonunda renk puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	5595.12	0.048*
Depolama süresi(S)	1	23.714	0.050*
SxM	4	0.306	0.863
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.16 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli çiğ sucukların üretim sonunda tat puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	1298.91	0.029*
Depolama süresi(S)	1	3.299	0.092
SxM	4	0.504	0.737
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.17 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli çiğ sucukların üretim sonunda tekstür puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	1976.78	0.039*
Depolama süresi(S)	1	0.014	0.911
SxM	4	0.849	0.551
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.18 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli çiğ sucukların üretim sonunda genel beğeni puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	8415.85	0.027*
Depolama süresi(S)	1	0.050	0.832
SxM	4	0.141	0.960
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.19 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli pişmiş sucukların üretim sonunda koku puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	7818.29	0.983
Depolama süresi(S)	1	11.751	0.019*
SxM	4	0.141	0.960
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.20 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli pişmiş sucukların üretim sonunda renk puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	4248.795	0.033
Depolama süresi(S)	1	6.230	0.055
SxM	4	0.453	0.642
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.21 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli pişmiş sucukların üretim sonunda tat puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	4097.01	0.048*
Depolama süresi(S)	1	0.06	0.940
SxM	4	1.739	0.278
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.22 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli pişmiş sucukların üretim sonunda tekstür puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	8903.01	0.049*
Depolama süresi(S)	1	0.326	0.593
SxM	4	1.222	0.407
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.23 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli pişmiş sucukların üretim sonunda genel beğeni puanları üzerine uygulamanın etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	5142.93	0.014*
Depolama süresi(S)	1	3.838	0.107
SxM	4	2.364	0.185
Hata	5		
Toplam	14		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.24 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların pH değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	5.248	0.001**
Üretim süresi(S)	2	3398.86	0.015*
SxM	8	0.965	0.490
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.25 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların pH değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	2.297	0.130
Depolama süresi(S)	3	8.359	0.001**
SxM	12	0.308	0.983
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.26 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların L^* değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	1.846	0.197
Üretim süresi(S)	2	116.628	0.001**
SxM	8	1.191	0.353
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.27 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların L^* değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.641	0.646
Depolama süresi(S)	3	29.209	0.001**
SxM	12	1.280	0.280
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.28 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların a^* değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.410	0.798
Üretim süresi(S)	2	352.448	0.001**
SxM	8	0.542	0.811
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.29 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların a^* değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.660	0.634
Depolama süresi(S)	3	55.610	0.001**
SxM	12	0.448	0.929
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.30 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların b^* değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.707	0.605
Üretim süresi(S)	2	21.012	0.001**
SxM	8	0.456	0.872
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.31 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların b^* değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	0.719	0.598
Depolama süresi(S)	3	15.184	0.001**
SxM	12	0.601	0.824
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.32 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların TBARM değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	71.086	0.001
Üretim süresi(S)	2	72.984	0.001
SxM	8	20.281	0.001**
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.33 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların TBARM değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	113.693	0.001**
Depolama süresi(S)	3	53.483	0.001**
SxM	12	0.574	0.845
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.34 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların sülfidril değerleri üzerine uygulamanın ve üretim süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	1.388	0.306
Üretim süresi(S)	2	65.968	0.001**
SxM	8	0.338	0.940
Hata	10		
Toplam	24		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.35 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların sülfidril değerleri üzerine uygulamanın ve depolama süresinin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	8.302	0.003**
Depolama süresi(S)	3	4.159	0.014*
SxM	12	0.631	0.799
Hata	15		
Toplam	34		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.36 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların ABTS değerleri üzerine uygulamanın ve sürenin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	10.540	0.001
Üretim süresi(S)	5	22.404	0.001
SxM	20	10.583	0.001**
Hata	25		
Toplam	54		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.37 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların FRAP değerleri üzerine uygulamanın ve sürenin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	3.908	0.001
Depolama süresi(S)	5	6.215	0.002
SxM	20	0.435	0.007**
Hata	25		
Toplam	54		

*P<0.05, **P<0.01

EK 4.38 Farklı konsantrasyonlarda peptit ilaveli sucukların peptit konsantrasyonu değerleri üzerine uygulamanın ve sürenin etkisini gösteren varyans analizi

Tween 20			
Varyans kaynağı	DF	F	P
Muamele grubu(M)	4	22.017	0.001
Depolama süresi(S)	5	103.264	0.001
SxM	20	1.170	0.003**
Hata	25		
Toplam	54		

*P<0.05, **P<0.01