



# Gıda kaynaklı protein ve biyoaktif peptit eldesi, saflaştırılması ve karakterizasyonunda kullanılan güncel yöntemler ve biyoinformatik yaklaşımlar

## Current methods used in the production, purification and characterization of food-derived proteins and bioactive peptides and bioinformatics approaches

Canan Kartal<sup>1,\*</sup> , Bahar Bakar<sup>2</sup> , Burcu Kaplan Türköz<sup>3</sup> , Semih Ötleş<sup>4</sup> 

<sup>1,2,3,4</sup> Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35100, İzmir Türkiye

### Öz

Günümüzde, beslenme alışkanlıkları ile insan sağlığı arasındaki ilişkinin ortaya konulması özellikle gıda kaynaklı biyoaktif bileşenleri hedef alan çalışmaların giderek artmasına sebep olmaktadır. Gıda kaynaklı peptitler ise sahip oldukları potansiyel biyoaktivite ile araştırmacılar için oldukça önemli bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Biyoaktif peptitler, birçok sağlık etkisine sahip olan spesifik amino asit dizileridir ve sindirim enzimleri, proteolitik enzimler veya fermantasyon sonucu gerçekleşen protein hidrolizi ile ortaya çıkmaktadır. Protein hidrolizatları ve peptitlerin elde edilmesinde geleneksel hidroliz metotlarının yanı sıra birçok yeni teknoloji kullanılmakta, saflaştırılması aşamasında ise yeni membran ve kromatografi yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Biyoaktivitesi tespit edilen peptitlerin amino asit dizileri ise çeşitli kütle spektrometresi yöntemleri ile belirlenmektedir. Bununla beraber, biyoaktif peptit tahminlemesi, tanımlanması, amino asit dizisi belirlenmesi ve karakterizasyonu amacıyla çok sayıda biyoinformatik araç geliştirilmiştir. Mevcut derleme, gıda kaynaklı protein ve hidrolizat eldesi, peptit ayrıştırılması, saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonu için kullanılmakta olan deneysel ve biyoinformatik yöntemlerin geniş bir literatür özeti sunmayı hedeflemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Protein, Biyoaktif peptit, Ekstraksiyon, Karakterizasyon, Biyoinformatik

### 1 Giriş

Proteinler, vücut içerisinde enerji ve amino asit kaynağı olarak görev alan ve vücudun gelişimi ile onarılmasında çok önemli bir rol oynayan makro besin öğeleridir. Gıda proteinleri bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabildiği gibi özellikle proteince zengin gıda işleme atıkları ve yan ürünleri de yeni ve sürdürülebilir protein kaynakları olarak değerlendirilmektedir [1]. Proteinler, sahip oldukları besin değerinin yanı sıra, gıda matrisleri içerisinde gösterdikleri fonksiyonel özellikler sebebiyle (emülsiyon oluşumu, köpük oluşumu, jelleşme, viskozite, tekstür, aroma bağlama vb.) gıda işleme teknolojisi açısından da önem taşımaktadır [2]. Günümüzde, beslenme ve sağlık arasındaki karmaşık ilişki

### Abstract

Nowadays, the revealing of the relationship between nutritional habits and human health causes an increase in the studies targeting especially food-derived bioactive components. Food-derived peptides, on the other hand, have emerged as a very important area for researchers with their potential bioactivity. Bioactive peptides are specific amino acid sequences that have many health effects, and they may occur as a result of protein hydrolysis with digestive enzymes, proteolytic enzymes or fermentation. In addition to traditional hydrolysis methods, many new technologies are used in the production of protein hydrolysates and peptides, and also in the purification phase, new membrane and chromatography methods are used. The amino acid sequences of the peptides whose bioactivity is detected, are determined by various mass spectrometry methods. In addition, many bioinformatics tools have been developed for the prediction, identification, determination of amino acid sequence and characterization of bioactive peptides. This review aims to present a broad literature review of experimental and bioinformatics methods for the obtaining of food-derived protein and hydrolysate, peptide separation, purification and structural characterization.

**Keywords:** Protein, Bioactive peptide, Extraction, Characterization, Bioinformatics

bir gerçek olarak artık bilinmektedir ve gıda bileşenlerine sadece metabolik aktiviteler için gerekli biyomoleküller olarak bakılmasının dışında, bu bileşenler vücutta istenen bazı fizyolojik etkileri tetikleyebilecek biyomoleküller olarak da değerlendirilmeye başlanmıştır [3]. Bu kapsamda ise gıda proteinleri, hidrolizatları ve peptitler son dönemde üzerinde en çok durulan biyoaktif moleküllerin başında gelmektedir [4].

Biyoaktif peptit (BAP), bir ana protein içerisinde inaktif durumda bulunan ve birbirlerine peptit bağı ile bağlı genellikle 2-20 amino asitten oluşan alt birimler olarak tanımlanmaktadır [2]. Bu alt birimlerin biyoaktivite gösterebilmeleri için proteoliz ile serbest hale geçmeleri

\* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: canan\_kartal@hotmail.com (C. Kartal)

Geliş / Received: 25.10.2022 Kabul / Accepted: 13.01.2023 Yayınlanma / Published: 15.04.2023

doi: 10.28948/ngumuh.1177148

gerekmektedir [5]. Peptitlerin biyoaktivitesi, peptit içerisinde bulunan amino asitlerin türü, dizilimi, peptit uzunluğu, molekül ağırlığı gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir ve bu peptitlerin antihipertansif, antidiyabetik, antioksidan, antitrombotik, antimikrobiyal, antikanser, opioid, bağışıklık sistemi düzenleme, mineral bağlama gibi çeşitli biyoaktif özelliklerle insan sağlığı üzerine pozitif etkisi olduğu literatür genelinde ortaya konulmuştur [6]. Biyoaktif peptit eldesi için süt ve süt ürünleri, yumurta, balık, hububatlar (pirinç, buğday, karabuğday, arpa, mısır vb.) gibi bitkisel ve hayvansal gıda kaynaklar kullanılmakta, ayrıca, gıda sektöründe ortaya çıkan ve proteince zengin olan gıda atıkları da (soya küspesi, zeytin çekirdeği, et işleme atıkları vb.) günümüzde biyoaktif peptit eldesi için kullanılan başlıca kaynaklar arasında yerini almaktadır [7].

Bu derleme, özellikle bitkisel kaynaklı gıdalardan protein ekstraksiyonu, hidrolizat/peptit eldesi, protein/peptit saflaştırılması ve karakterizasyonunu kapsayan mevcut literatürün kapsamlı bir özetini sunmakta ve bu alanda kullanılan güncel metotları biyoinformatik yaklaşımını da kapsayan geniş bir bakış açısıyla değerlendirmeyi hedeflemektedir.

## 2 Gıda kaynaklı protein eldesi

Protein ekstraksiyonu amacıyla kullanılan yöntemlerin sınıflandırılmasında çeşitli bakış açıları kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, ekstraksiyon koşullarına göre; kuru koşullarda gerçekleştirilen (öğütme ve eleme, hava ile sınıflandırma, elektrostatik ayırma vb.) ve kuru olmayan koşullarda gerçekleştirilen (tek başlarına veya kombinasyonlar halinde çeşitli kimyasal, biyokimyasal, fiziksel yöntemler) ekstraksiyondur [8, 9]. Ayrıca, protein ekstraksiyonu, geleneksel yöntemler (organik çözügen, asit, alkali vb. kimyasal yöntemler) veya daha yeni ve yeşil ekstraksiyon yöntemleri (ultrases destekli, mikrodalga destekli, enzim destekli ekstraksiyon, subkritik/süperkritik sıvı ekstraksiyonu vb.) olmak üzere 2 temel sınıfa da ayrılabilir [1].

Proteinlerin kimyasal ekstraksiyonunda alkali, asit, su ve organik çözücü olmak üzere birçok ekstraksiyon çözücüsü tek başına veya bir arada kullanılmakta ve çözücü seçimi protein örneğinin yapısına göre belirlenmektedir. Bitkisel kaynaklardan protein ekstraksiyonunda, genel olarak en çok kullanılan yöntemlerin başında alkali ekstraksiyonu gelmektedir [10]. NaOH, ortam pH'nın ayarlanmasında en çok kullanılan alkalidir ve bir çözügen olarak da ortama eklenebilmektedir [9]. Alkali ortam hem hücre duvarının parçalanmasını sağlamakta hem de ortamın proteinlerin büyük çoğunluğunun izoelektrik noktası olan pH 4-5 aralığından daha yukarıdaki bir pH değerinde olması ile proteinlerin çözünürlüğünü arttırmaktadır [10]. Ayrıca hububatlar gibi kükürt içeren amino asitlerce zengin kaynaklarda oluşan disülfid çapraz bağlarını kırarak protein çözünürlüğünün artmasına da yardımcı olduğu bildirilmiştir [10]. Fakat alkali ortam, ortamda lignin ve selülozun da çözünmesi, olası protein denatürasyonu, hidroliz, çapraz bağlanma ile lizinoalanin oluşumu, amino asitlerin rasemizasyonu ve zorunlu amino asitlerin kaybı gibi

istenmeyen sonuçlara da yol açabilmektedir [9]. Wang vd. [11], pirinç kepeği protein ekstraksiyonu için alkali su ortamı kullanmış ve asitle çöktürme ile protein eldesini gerçekleştirmiştir. Pirinç kepeği protein fraksiyonlarının eldesi için ise, albümin ve globülin fraksiyonları için %2 NaCl, prolamin fraksiyonu için etanol, glutelin fraksiyonu için ise 0.1 N NaOH kullanmıştır. Ayrıca, yüksek yağ içerikli zeytin çekirdeğinden depo proteinlerinin ekstraksiyonunda kloroform [12], damıtık tahıldan protein ekstraksiyonu için ise sulu etanol ve alkali etanol [13] kullanılmıştır. Protein ekstraksiyonunda çöktürme aşamasında da trikloroasetik asit (TCA), aseton, metanol ve TCA/aseton karışımı [12] veya belli bir konsantrasyonda sulu etanol [14] gibi organik çözücülerden yararlanılmıştır. Alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme, tuz ekstraksiyonu/diyaliz ve misel çöktürme de bu alanda kullanılan diğer yöntemlerdir [15].

Kimyasal ekstraksiyon yöntemleri haricinde, enzim destekli ekstraksiyon, subkritik su ekstraksiyonu/süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve ayrıca, hücre duvarının tahrip edilmesine dayanan; ultrases destekli ekstraksiyon, yüksek basınç destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon gibi yöntemler tek başlarına, beraber veya kimyasal yöntemlerle bir arada kullanılmaktadır [1]. Enzim destekli ekstraksiyonda, asidik veya bazik koşullarda proteazlar [16, 17] ve karbohidrolazlar [18, 19] ayrı ayrı veya bir arada kullanılabilir gibi [20], protein veriminin artırılması amacıyla alkali veya su ekstraksiyonunu destekleyici olarak da kullanılmaktadır [21, 22]. Subkritik su ekstraksiyonu (SBSE), belli basınç altında (10-60 bar) tutulan sıcak suyun (100-374°C) dielektrik sabitinin etanole yakın bir değere düşürülmesi prensibine dayanmaktadır [23]. Süperkritik sıvı ekstraksiyon (SKSE) ise, kullanılan akışkanın kritik noktası üzerinde uygulanan basınç ve sıcaklık sonucu, sıvılar gibi bir yoğunluğa sahip olan akışkanın aynı zamanda gaz gibi sıkıştırılabilir hale getirilmesi ve böylece düşük viskoziteye ve göreceli yüksek difüzyona sahip bir akışkan eldesine dayanmaktadır [23]. SBSE yöntemi pirinç kepeği ve soya küspesinden protein ekstraksiyonunda kullanılmış [24], ayrıca yağı uzaklaştırılmış pirinç kepeğinden protein ve amino asit eldesinde alkali hidroliz yöntemine göre daha yüksek bir verime sebep olduğu belirtilmiştir [25]. SKSE yöntemi ise literatür genelinde özellikle proteinlerin fraksiyonlarına ayrılması, saflaştırma ve çöktürülmesinde pH ve termal destabilizasyonlara karşı bir alternatif olarak kullanılmaktadır [26, 27]. Ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon, protein verimini arttırabilmekte ve ayrıca elde edilen protein izolatının konformasyonunda değişikliğe sebep olabilmektedir [28, 29]. Bununla beraber, belirli bir ultrasonik güç ve ultrasonikasyon süresi aşıldığında protein veriminde hidroliz, agregasyon ve protein denatürasyonuna bağlı bir azalmanın olduğu da gözlemlenmiştir [30]. Preece vd. [31] soya işleme atığından protein ekstrakte ettiği çalışmada, hidrodinamik kaviteasyonun hücre parçalanmasına ve partikül boyutunda küçülmeye sebep olarak protein veriminde ultrasonikasyondan daha yüksek bir protein eldesi sağladığını fakat, yüksek basınç homojenizasyon sisteminden artan geçiş sayısı ile üründe

dinamik viskoziteyi artırarak partikül boyutunda ise büyümeye yol açarak ekstraksiyon veriminde düşüşe yol açtığını belirtilmiştir. Ayrıca yüksek basınç uygulamalarının proteinlerde tersinir ve tersinir olmayan yapısal değişiklere yol açtığı, denatürasyon, agregasyon, jelleşme, yüzey hidrofobikliğinde değişime sebep olduğu ve allerjenite azalmasına sebep olabildiği belirtilmektedir [32]. Ekstraksiyon aşamasında mikrodalga kullanılması proteinlerin birincil yapısını etkilemezken ikincil yapısında değişikliklere yol açmakta, bu değişiklik ile proteinlerin yağ absorpsiyonu, su absorpsiyonu, köpük oluşturma kapasitesi, emülgatör özelliği ve protein sindirilebilirliğinde iyileşme elde edilebilmektedir [8]. Geleneksel yöntem olan alkali ekstraksiyonuna kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyon ile pirinç kepeğinden protein eldesinde daha yüksek verime ulaşılmış [33, 34], enzim destekli ekstraksiyon ile ise birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir [33]. Hücre duvarının parçalanmasını hedefleyen ve elektrik temelli (termal olmayan) bir yöntem olan vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon, protein eldesinde kullanılan yeni bir yaklaşım olmakla beraber [1], bu yöntemle geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek verim elde edilebileceği belirtilmektedir [35]. Bu yöntem enzim destekli ekstraksiyonla beraber kullanıldığında ise protein verimi, çözünürlüğü ve emülsifiye edici özelliği arttırdığı, köpük oluşturma ve viskozite de ise azalma yarattığı belirlenmiştir [36].

Bu yöntemler haricinde sıvı bifazik flotasyon [37], ters misel [38], sulu iki faz sistemler (iyonik sıvılar, derin ötektik çözücüler vb.) [39, 40] gibi yeni ve yeşil teknoloji odaklı yöntemler de literatür genelinde protein ekstraksiyonu için kullanılmaktadır.

### 3 Gıda kaynaklı biyoaktif peptit eldesi

Gıda kaynaklı BAP'ler, gıdaların depolanması veya çeşitli gıda işleme süreçleri (olgunlaşma, fermantasyon, pişirme vb.) sonucunda ana proteinden kendiliğinden serbest hale geçebildikleri gibi, insan vücudunda gastrointestinal sistemde gerçekleşen hidrolizle de oluşabilmektedir [41]. Buna karşılık, enzimatik veya mikrobiyal hidroliz ile istenilen spesifik biyoaktiviteye sahip peptit parçalarının eldesi günümüzde en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmekte [41] ayrıca, kimyasal sentezleme, rekombinant DNA teknolojisi ve enzimatik sentezleme gibi yöntemler de BAP eldesinde kullanılmaktadır [42].

Protein hidrolizinde kullanılan yöntem çoğunlukla protein kaynağına göre farklılık göstermektedir. Keratin yapısına sahip proteinler için asidik veya alkali işlem ile kimyasal hidroliz tercih edilirken kazein, peynir altı suyu, et gibi hayvansal ürünler ve bitkisel proteinler daha çok enzim ve mikrobiyal hidroliz yöntemleri ile hidroliz edilmektedir [43]. Proteinlerin asit kullanılarak hidroliz edilmesi efektif ve düşük maliyetli bir yöntem olarak kabul edilmesine karşın triptofanın tamamen parçalanması, metiyoninde kısmi kayıp ve glutaminin glutamata, asparajinin aspartata dönüşmesi gibi önemli negatif etkileri bulunmaktadır [43]. Alkali hidrolizi ise, asit gibi düşük maliyete sahip ve triptofanın korunduğu bir yöntem olmakla birlikte, amino asitlerin parçalanması, rasemizasyon, ısı ve alkali etkisiyle lizinoalanin oluşumu ve amino asitler arası çapraz bağların

oluşması gibi negatif etkilere de yol açabilmektedir [43, 44]. Ayrıca, kimyasal hidroliz ile seçici olmayan bir hidrolizin gerçekleşmesi ve yüksek kül içeriğine sahip ürünlerin oluşması, kullanılan güçlü kimyasalların hidrolizatların görünüşünü, çözünürlüğünü, tadını ve biyokimyasal güvenliğini değiştirmesi sebebiyle protein hidrolizinde alternatif biyolojik yöntemlerin kullanılmasına yol açmaktadır [45].

Fermantasyon, enzimatik hidroliz ve gastrointestinal sindirimin taklit edilmesi, proteinlerin hidrolizinde kullanılan başlıca biyolojik yöntemlerdir. Proteinlerin sindirilebilirliğinin ve çözünürlüğünün iyileştirilmesi, ayrıca alerjik özelliklerinin azaltılması amacıyla kullanılan enzimatik hidroliz, biyoaktif peptit eldesi amacıyla da kullanılmaktadır [46]. Laboratuvar ortamından kolaylıkla daha büyük ölçüğe geçilebilmesi, daha kısa reaksiyon süresi, mikroorganizmalara göre daha rahat kontrol edilebilen bir ortamda gerçekleşmesi ve önceden belirlenmiş bir biyoaktivite sahip spesifik peptitlerin elde edilebilmesi, enzimatik hidroliz yöntemini günümüzde BAP eldesinde en çok tercih edilen yöntemlerden biri haline getirmiştir [4]. Proteinlerin enzimatik hidrolizinde kullanılan enzimler hayvansal kaynaklı (pankeratin, tripsin, pepsin, karboksipeptidaz, aminopeptidaz), bitkisel kaynaklı (papain, bromelain) veya farklı aktivite koşullarına sahip ve geniş bir ölçekte yer alan bakteri veya mantar kaynaklı enzimler olabilmektedir [43]. Kullanılan proteazlar tek başlarına veya bir arada, sırayla veya karışım halinde kullanılabilir ve sahip oldukları substrat seçiciliği ile kimyasal ve besinsel olarak istenilen özellikte peptitler elde edilebilmektedir. En çok kullanılan proteazlar arasında; peptit bağının C-ucunda arjinin veya lizin olduğunda kesen tripsin, fenilalanin ve lösinden sonra gelen peptit bağını kesen pepsin, alanin, valin, lösün, isolösün, fenilalanin, triptofan ve tirozin içeren hidrofobik bölgelerdeki peptit bağlarını kesen papain, ve tercihen N-ucunda fosforlanmış bölgeyi ve C-ucundaki hidrofobik bölgelerdeki peptit bağlarını hidroliz eden pankreatin sayılabilmektedir [47]. Keten tohumu proteinlerinden antioksidan peptit eldesi [48], soya proteininden antihipertansif peptit eldesi [49], kinoa çekirdek proteininden antidiyabetik ve antioksidan peptit eldesi [50], enzimatik hidroliz yönteminin kullanıldığı çalışmalara örnek olarak verilebilir. Ayrıca, pepsin, pankreatin, kimotripsin gibi enzimlerin birlikte kullanılarak gastrointestinal sindirimin taklit edilmesiyle, kinoa proteininden antidiyabetik [51], soya unundan antioksidan [52] ve Adzuki fasulyesinden antiinflamatuar [53] peptitler elde edilmiştir. Proteinlerin enzimatik hidrolizi için gıdalarda kullanılabilir enzimler genellikle tercih edilse de yüksek maliyet, göreceli düşük peptit verimi, ortam pH ve sıcaklığının sıkı kontrol gereksinimi ve gıda proteinlerinin kompleks yapısı dolayısıyla enzim-substrat etkileşiminin kısıtlı düzeyde olması bu yöntemin dezavantajlarıdır [54].

Maya, küf ve bakteriler tarafından gerçekleştirilen mikrobiyal fermantasyon, birçok hücre içi ve hücre dışı proteolitik enzimle gerçekleşen proteoliz sonucu biyoaktif peptit eldesinde kullanılan başka bir yöntemdir. Özellikle laktik asit bakterileri, güvenli olmaları ve yüksek proteolitik etkiye sahip olmalarının yanı sıra, kendi içinde sahip olduğu

çeşitlilik ile hayvansal veya bitkisel ortamlara kolayca uyum sağlamaktadır ve peptit eldesinde oldukça fazla tercih edilmektedir [55]. Laktik asit bakterileri ile fermentasyon yöntemi, soya proteininden antihipertansif peptit eldesinde [56], süt proteininden multifonksiyonel peptit eldesinde [57], ekşi mayadan antioksidan peptit eldesinde [58], soya sütünden antihipertansif peptit eldesinde [59] kullanılmıştır. Mikrobiyal fermentasyon ile gerçekleşen protein hidrolizi göreceli yüksek maliyeti ve kontaminasyon riski gibi dezavantajları olsa da aynı zamanda ortamdaki hiperallerjenik veya anti-besinsel öğelerin (tripsin inhibitörleri, glisin, fitat, saponin vb.) fermentasyonla uzaklaşması bu yöntemin başlıca avantajlarından biridir [43].

Geleneksel metotların yanı sıra, proteinlerin hidroliz düzeylerini artırmak amacıyla genellikle enzimatik hidroliz ile bir arada uygulanan hidrostatik basınç, ultrases, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ohmik ısıtma, vurgulu elektrik alan ve süper kritik su hidrolizi gibi yeni teknikler de biyoaktif peptit eldesinde kullanılmaktadır [54].

### 3.1 Biyoaktif peptitlerin ayrılması ve saflaştırılması

#### 3.1.1 Filtrasyon

Protein hidrolizi sonucu elde edilen ham hidrolizat, farklı zincir uzunluğuna, hidrofobik yapıya ve net yüke sahip polipeptitler, kısa zincirli peptitler, serbest amino asitler ve hidrolize olmayan proteinleri içeren bir karışımdır. Bu karışım içerisinde istenilen biyoaktiviteye sahip peptitlerin tespit edilmesi, yapısının ve diziliminin belirlenmesi amacıyla moleküler ağırlık, yük, hidrofobisite gibi özelliklere dayanan çeşitli ayırma ve saflaştırma teknikleri uygulanmaktadır. Hidroliz sonrası elde edilen protein hidrolizatına uygulanan ayırma ve saflaştırma tekniklerinde ilk basamak olarak genellikle membran filtrasyon (MF) tekniği kullanılmaktadır [60]. Membran kullanımı, itici gücü basınç farkı olan teknikler (mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon), itici gücü potansiyel fark olan teknikler (elektrodializ, elektroforez vb.) ve elektrik potansiyel ile basıncın birleştirdiği teknikler (elektrofiltrasyon, elektrofiltrasyon vb.) olmak üzere sınıflara ayrılmaktadır [61]. Ultrafiltrasyon yönteminde (UF), değişen boyutlarda geçirgenliğe sahip membranlar kullanılarak yüksek moleküler ağırlığına sahip polipeptitler hidrolize olmayan proteinden veya enzimlerden ayrılabilen, hidroliz sonucu elde edilen kısa peptitler fraksiyonlarına ayrılarak konsantre edilebilmektedir [62-64]. Bununla beraber geleneksel UF işleminde, yarı geçirgen membranlar ile hidrofobik peptitler arasında olası interaksiyonlar meydana gelmesi, filtrasyon verimliliğinin farklı gözenek boyutlarının normal dağılımından etkilenmesi, özellikle yüksek örnek konsantrasyonlarda büyük partiküllerin de filtre olabilmesi, göreceli yüksek örnek miktarına ihtiyaç duyulması, peptitlerin geri kazanımı için fazladan bir basamağa daha ihtiyaç duyulabilmesi gibi dikkate değer zorlukları da bulunmaktadır [65].

Geleneksel membran filtrasyonunda akışın ve membran seçiciliğinin iyileştirilmesi ve daha etkin bir ayırımı sağlanması amacıyla basınç itici gücüne ek olarak dışsal bir elektrik alan uygulaması da kullanılmaktadır [66, 67].

Elektrodializ yöntemiyle ultrafiltrasyonun birleştirilmesi, keten tohumu hidrolizatının fraksiyonlara ayrılmasında [68], soya peptitlerinin saflaştırılmasında [69] ve kolza tohumu protein hidrolizatının ayırımı ve konsantrasyonunda [70] kullanılmıştır. Bununla beraber, Langevin vd. [71], nanofiltrasyon (NF) ile elektrodializ-ultrafiltrasyon (EDUF) kombine yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında, NF ile küçük ve spesifik moleküler ağırlığına sahip peptit fraksiyonları elde ederken, EDUF ile daha geniş bir moleküler dağılımına ve ayrıca daha fazla polar amino asit miktarına sahip fraksiyonlar elde edildiği belirtilmiştir. Elde edilen fraksiyonların antioksidan kapasitelerine bakıldığında ise, her iki yöntemde elde edilen yüksek kapasitenin birbirinden farklı fraksiyonlarda elde edildiği görülmektedir. Sonuç olarak, optimize ve daha spesifik peptit fraksiyonlarının elde edildiği bir sistem için bu iki yöntemin aynı ayırma sürecinde birlikte kullanılması gerektiği önerilmiştir.

#### 3.1.2 Kromatografik yöntemler

BAP ayrıştırılması ve saflaştırılması aşamalarında genellikle birden fazla kromatografik yöntem bir arada kullanılmaktadır (Tablo 1). Peptitleri zincir uzunluğuna veya moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan boyut dışlama kromatografisi (SEC), membran filtrasyon teknikleri ile beraber peptit eldesinin ilk aşamasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [65]. SEC yönteminde, moleküllerin gözenekli bir sabit faz ile interaksiyonu sonucu elüsyon sırası moleküler ağırlığını takip etmektedir. Böylece, yüksek moleküler ağırlığına sahip olanlar gözeneklerden dışlanarak ilk önce kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller ise gözeneklere erişerek kolon içerisinde daha geniş bir yüzeye nüfuz etmekte ve daha uzun zamanda kolondan ayrılmaktadır [72]. SEC yöntemi analitin özelliklerine bağlı olarak jel filtrasyon kromatografisi (GFC) ve jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) olarak ikiye ayrılmaktadır. GFC yöntemi, suda çözünen bileşenlerin ayırımı için tercih edilmektedir ve polar fonksiyonel gruplara sahip gözenekli partiküllerle paketlenmiş kolonlarda, su içeren mobil fazlar ile gerçekleştirilmektedir. GPC yönteminde ise, suda çözünmeyen bileşenler için polar olmayan kolonlar ve çözümler kullanılmaktadır [73]. İyon değişim kromatografisi (IEC), hareketli fazdan (tampon çözelti ve örnek) gelen yüklü moleküller ile sabit fazdaki ters yüke sahip gruplar arasında gerçekleşen interaksiyona dayanmaktadır. Proteinlerin ters yüke sahip bir sabit faza bağlanması veya kolondan ayrılması, proteinin yüklü grupları ile karşıt yüklü iyonlara sahip tampon çözelti arasında gerçekleşen rekabetin sonucudur [74]. IEC yönteminde seçicilik, özel bir iyon değiştiriciye bağlanan çözünen maddelerin serbest enerjilerindeki farklılıktan ve bu maddelerin yükleri, yük yoğunlukları ve yüzeylerindeki yük dağılımlarıyla ortaya çıkan çeşitli düzeydeki interaksiyonlar tarafından belirlenmektedir. Bu interaksiyonlar ise, mobil fazın iyonik kuvveti ve pH değeri ile kontrol edilebilmektedir [75]. Anyon değişim kromatografisi (AEC) ve katyon değişim kromatografisi (CEC) olarak ikiye ayrılan IEC yönteminde, sentetik resin veya polisakkarit destek materyalleri kullanılmaktadır [76]. Asidik kalıntılara sahip

**Tablo 1.** BAP ayrıştırma, saflaştırma ve tanımlanmasında kullanılan kromatografik yöntemler

Kaynak	Ayırma/saflaştırma yöntemi	Biyoaktivite	Peptit tanımlama	Kaynak
Siyah soya fasulyesi küspesi	UF, GFC, RP-HPLC	Antioksidan ve antikanser	ESI-MS/MS	[62]
Amarant tohumu	RP-HPLC	Antihipertansif, antitrombotik, antioksidan	MALDI-TOF	[80]
Perilla tohumu	GFC, RP-HPLC	Antioksidan	UPLC-QTOF MS/MS	[81]
Çiya tohumu	UF	Antioksidan	-	[82]
Fındık	GFC, RP-HPLC	Antioksidan ve sitoprotektif etki	HPLC-QTOF MS	[83]
Buğday embriyosu	RP-HPLC	Antioksidan, antikanser, antihipertansif	Nano-LC/ESI-MS/MS	[84]
Bira mayşe atığı	MF, yarı-preparatif HPLC	Antidiyabetik	UPLC-MS/MS	[85]
Kinoa	GP-HPLC	Antidiyabetik ve antioksidan	-	[50]
Pirinç kepeği	UF, IEC, preparatif HPLC	Antikanser	MALDI-TOF/TOF MS	[86]
Nohut tohumu	IEC, GFC, RP-HPLC AC, GFC	Antioksidan Şelatlama aktivitesi	MALDI-TOF-MS/MS -	[87] [88]
Erik çekirdeği	UF	Antioksidan, antihipertansif	HILIC ve RP-HPLC-Q-TOF MS/MS	[89]
Zeytin çekirdeği	UF, yarı-preparatif RP-HPLC	Antihipertansif, antiproliferatif	HILIC ve RP-HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS	[90]
Ayçiçeği	AC, RP-HPLC	Antihipertansif	-	[91]
Palm çekirdeği küspesi	Yarı-preparatif RP-HPLC, izoelektrik fokuslama	Antioksidan	UHPLC-Q-TOF MS/MS	[92]

peptitler olsa da çoğu peptidin pH 8.5 altında nötr veya bazik net yüke sahip olması dolayısıyla genel olarak anyon değişim kromatografisi çok kullanılmamakta, bunun yerine güçlü katyon değişim kromatografisi, özellikle hidrofobikliğe dayanan ters-faz yüksek basınç sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemiyle birlikte yaygın olarak tercih edilmektedir [77]. RP-HPLC, hidrofobik sabit fazın, polar bir hareketli fazdaki hidrofobik analit ile interaksyonuna dayanan bir yöntemdir ve peptitler sahip oldukları hidrofobik yapıya ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaktadır. Böylece düşük moleküler ağırlığa sahip düşük düzeyde hidrofobik peptitler kısa alıkonma zamanına sahiptir ve kolondan önce ayrılmaktadır [65]. RP-HPLC özellikle laboratuvar düzeyinde yapılan çalışmalarda sahip olduğu etkinlik, çeşitlilik ve otomasyon kabiliyeti ile sıklıkla başvurulan metotların başında gelmektedir [78].

Ayrıca bu tekniklere ek olarak, ultra yüksek basınç sıvı kromatografisi (UHPLC), hidrofilik interaksyonlar sıvı kromatografisi (HILIC), affinite kromatografisi ve izoelektrik odaklama yöntemleri de peptit ayrıştırılması ve saflaştırılması aşamasında kullanılan diğer yöntemlerdir [2].

### 3.2 Biyoaktif peptitlerin tanımlanması

Günümüzde, Edman degradasyonu gibi farklı teknikler bulunuyor olsa da kütle spektrometresi (MS) peptit tanımlanmasında ve amino asit dizilimlerinin belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntem olarak öne çıkmaktadır (Tablo 1). Edman degradasyonuna dayanan dizilim belirleme yönteminde, yoğun bir saflaştırma aşamasına ihtiyaç duyulması ve göreceli düşük hassasiyeti, peptit dizilerinin belirlenmesinde MS yönteminin yaygınlaşmasının en önemli sebepleridir [55]. Genellikle elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile eşleştirilmiş sıvı kromatografisinin kullanıldığı peptit tanımlama çalışmalarında, kütle analizatörleri olarak;

kuadropol (Q), uçuş zamanlı (TOF), iyon tuzaklı, Q-TOF, TOF-TOF, Q-iyon tuzaklı sistemleri kullanılmaktadır (Tablo 1). Ayrıca, TOF kütle analizatörü ile eşleşmiş matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) veya ardışık kütle spektrometresinin (MS/MS) kullanıldığı çok sayıda çalışma da literatür genelinde bulunmaktadır [79].

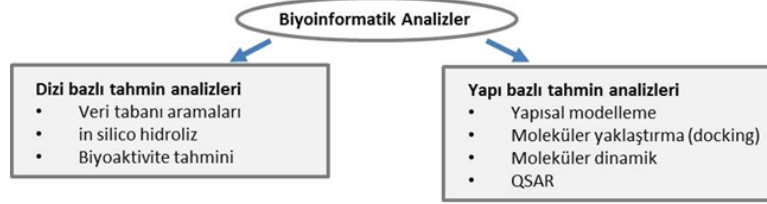
## 4 Biyoinformatik yöntemler

Biyoinformatik; biyolojik verilerin toplanması, işlenmesi, paylaşılması ve yenilerinin oluşturulmasını sağlayan ve bu sırada da bilgisayar yazılımlarını kullanan disiplinler arası bir bilim dalıdır [93]. Protein/peptit araştırmalarında biyoinformatiğin en temel prensibi, aminoasit dizisinin polipeptidin nasıl katlanacağını (yapısını) belirlemesi ve yapının da doğrudan fonksiyonla ilişkili olmasıdır [94]. Bu prensip sayesinde, yapısal veya fonksiyonel benzerlikler tahmin edilebilmektedir. Veri tabanları, protein/nükleotid/peptitler ile ilgili bilgilerin sınıflandırılıp depolandığı platformlardır ve DNA – RNA dizileri, amino asit dizisi, protein-peptit yapısı, literatür çalışmaları, mutasyon çalışmaları, taksonomik bilgiler gibi birçok biyolojik veriyi içermektedir. En geniş kapsamlı ve genel veri tabanları olarak NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) ve DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) kabul edilmektedir. Birbiriyle güncel veri paylaşımında da bulunan bu veri tabanlarına çevrim içi olarak ücretsiz olarak erişilebilmektedir [95].

Gıda bilimlerinde biyoaktif peptit araştırmaları, sağlık ve beslenme arasındaki ilişkiye verilen önemin artmasıyla beraber ilgi çeken ve üzerine oldukça fazla çalışılan alanlar haline gelmiştir. Bu çalışmaların çoğunda biyoinformatik



Şekil 1. Gıda bilimlerinde biyoaktif peptit araştırmalarında biyoinformatiğin genel kullanım alanları



Şekil 2. Dizi bazlı ve yapı bazlı analizlerin sınıflandırılması

analizlerden yararlanıldığı görülmektedir [96]. Biyoinformatiğin bu çalışmalarda karşılaşılan genel kullanım alanları Şekil 1’de verilmiştir.

Biyoinformatik analizlerde ilk adım amino asit dizisinin bulunmasıdır. Bunun için incelenen gıda örneğindeki protein veya peptitlere ait anahtar kelimelerle veri tabanlarında arama yapılarak, genellikle analizlerde kullanılan FASTA formatındaki diziyeye erişilebilmektedir. BAP çalışmalarında en çok kullanılan analizler Şekil 2’deki gibi sıralanabilir.

Biyoinformatik analizleri dizi bazlı ve yapı bazlı analizler olarak sınıflandırmak mümkündür. BAP’lara ait genel veri tabanları olmakla birlikte çok sayıda da biyoaktif özelliğine göre sınıflandırıldığı veri tabanları bulunmaktadır. Genel arama yapılabilecek veri tabanlarına örnek olarak UniProt-Peptide Search (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>), PepBank (<http://pepbank.mgh.harvard.edu/search/basic>), EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/>) PeptideAtlas ([https://db.systemsbio.org/sbeams/cgi/PeptideAtlas/Search?\\_tab=1](https://db.systemsbio.org/sbeams/cgi/PeptideAtlas/Search?_tab=1)) verilebilirken, antimikrobiyal peptitler için CAMP-R3 (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>), DPPIV inhibitör peptitler için IDPPIV-SCM (<http://camt.pythonanywhere.com/iDPPIV-SCM>), ACE inhibitör peptitler için AHTPDB (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>) örnek olarak sayılabilir. Bunlarla birlikte, BAP’larla ilgili veri tabanları [97, 98] çalışmalarında kapsamlı olarak listelenmiştir. BIOPEP-UWM™ (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) ve FeptideDB ([http://www4g.biotec.or.th/FeptideDB/enzyme\\_digestion.php](http://www4g.biotec.or.th/FeptideDB/enzyme_digestion.php)) gıda kökenli biyoaktif peptitler için özelleştirilmiş veri tabanları ve ayrıca proteinin biyoaktivite profilinin tahmin edilebildiği platformlardır [99, 100]. BIOPEP-UWM™ peptitlerin duyuşal ve alerjenik özellikleri için de bir veri tabanı ve tahmin aracıdır.

*in silico* hidroliz analizi bir diğer dizi bazlı analizdir; protein zincirinde, spesifik enzimler tarafından kesilebilecek yerler bellidir ve bu bölgelerdeki bağların kırılması simüle edilerek açığa çıkabilecek olası peptitler tahminlenebilmektedir [101]. *in silico* araçlarda enzim

taraması yapmak çok hızlı olduğundan deneylere başlamak için iyi bir referans noktasıdır ve farklı kaynakların BAP potansiyelini inceleyen çok sayıda çalışma vardır [102, 103]. Yukarıda bahsedilen BIOPEP-UWM™ ve FeptideDB dışında ExPasy-PeptideCutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) yaygın olarak kullanılan bir diğer *in silico* hidroliz aracıdır. *in silico* hidrolizin sınırlandırıldığı nokta, proteinin birincil yapısını dikkate alarak bir tahmin üretmesidir. Ancak proteinler üç boyutlu bir katlanmaya sahip oldukları için dizi düzeyinde yapılan bu tahminlerin deneysel olarak mutlaka kanıtlanmalıdır. Bununla birlikte, proteinlerin üç boyutlu yapısı çeşitli ön işlemlerle (yüksek sıcaklık, ultrases, ohmik ısıtma, mikrodalga vb.) bozulabilmektedir [54]. Böylece enzimin erişebileceği alanlar açılır ve *in silico* hidroliz tahminlerine yaklaşılabilir.

Dizi düzeyindeki analizler, fonksiyonu tahmin etmede çok değerli bilgiler sağlamaktadır. Ancak, fonksiyonun daha iyi anlaşılması için yapı bazlı analizlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı peptitler proteinler gibi daha kararlı bir yapıya sahipken, çoğu peptit esnek yapıdadır. Çevre koşullarına göre ve etkileşeceği moleküle göre farklı konformasyonlarda bulunabilmektedirler [104]. Peptit yapılarının deneysel olarak çözüldüğü tekniklerden bazıları X ışını kristalografisi [105], nükleer manyetik rezonans [106] ve küçük açı X ışını saçılımı [107] olarak sıralanabilir ve çözülen yapılara PDB (<https://www.rcsb.org/>), StraPep (<http://isyslab.info/StraPep/>), SATPdb (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/satpdb/about.php>) gibi veri tabanlarından erişilebilmektedir. Peptit yapısının çözümündeki zorluklar nedeniyle özellikle protein-peptit etkileşimlerini aydınlatılmak için hesaplamalı tahminler önem taşımaktadır. Peptit yapılarının modellenilebildiği programlara örnek olarak PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>), PEPstrMOD (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/pepstrmod/>) verilebilir. Bununla birlikte yapay zeka ile protein/peptit yapıları hesaplayan yazılımlar da son yıllarda başarıyla kullanılmaya başlanmıştır ve en güncel araca örnek olarak

AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A0A0A1I6N9>) gösterilebilir.

Kantitatif yapı aktivite ilişkisi (Quantitative structure-activity relationship; QSAR), moleküllerin yapısı ve biyofiziksel özellikleri ile biyoaktiviteleri arasında bir korelasyon bulmak için matematiksel modellerin oluşturulduğu bir metottur [108]. QSAR, peptit yapıları ile spesifik aktiviteleri arasındaki ilişkiyi anlamak, yeni bir kaynaktan elde edilmiş veya dizayn edilmiş peptitlerin aktivitelerini tahminlemek için kullanılmaktadır. QSAR genel hatlarıyla dört basamakta gerçekleştirilmektedir [109]. İlk adımda, peptitlere ait dizi, yapısal ve fizikokimyasal (boyut, büyüklük, hidrofobiklik, polar yük), biyolojik aktivite verileri (IC<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>) literatürden veya veri tabanlarından bulunur. İkinci adım, tanımlayıcıların seçilmesidir. Toplanan bu özellikler nümerik verilerle tanımlanır. Geçmiş çalışmalarda araştırmacıların oluşturduğu tanımlayıcı sistemler yayınlanmıştır [110-113] ve bu tanımlayıcılar güncel çalışmalarda da kullanılmaktadır. Ardından bilgisayar destekli bir matematiksel model oluşturulur ve karakterize edilmiş peptitler ile model validasyonu yapılmaktadır. Son adımda da model doğrulandıktan sonra yeni peptidin biyoaktivite potansiyeli tahmin edilmektedir [109].

Moleküler yaklaşırma, kenetleme olarak bilinen teknik literatürde yaygın olarak docking olarak adlandırılmaktadır. Docking, moleküller arasındaki etkileşiminin nasıl olacağını tahmin eden bir simülasyon tekniğidir. Olası tüm atom etkileşimleri değerlendirilerek enerji minimizasyonu yapılmaktadır [114]. Etkileşim mekanizmasının çözülmesi ile docking, farklı ligand veya inhibitörler keşfedilmesi, mutasyon çalışmaları, homolog sistemlerin aydınlatılmasında oldukça önemlidir.

Moleküler dinamik, bir molekülün veya kompleksin sınırlanmış bir zaman içinde (yüzlerce ps ve ns), çeşitli koşullar altındaki değişiminin atomik düzeyde incelenmesidir [115, 116]. Bu teknik, ligand-protein etkileşimi gibi iki molekülün bağlanma özelliklerini tahmin etmede çok yardımcıdır. İlaç tasarımında aktif moleküllerin taranmasında ve peptitlerin hedef proteinlere bağlanma ayrıntılarının incelenmesinde kullanılan bir metottur.

## 5 Sonuç

Bitkisel veya hayvansal gıda kaynaklarından ve gıda işleme atıklarından elde edilebilen BAPler, sağlık üzerinde sahip oldukları potansiyel olumlu etkileriyle özellikle fonksiyonel gıda pazarında oldukça dikkat çekmektedir. Günümüzde, protein ekstraksiyonu ve hidrolizat eldesinde geleneksel yöntemler (kimyasal yöntemler, enzimatik yöntemler vb.) kullanılmakla beraber özellikle son yıllarda protein verimini ve hidroliz düzeyini arttırmak amacıyla ultrases, mikrodalga, hidrostatik basınç, ohmik ısıtma, vurgulu elektrik alan, subkritik su/süperkritik sıvı gibi yeni tekniklerden de oldukça yaygın şekilde yararlanılmaktadır. Protein hidrolizatlarından biyoaktif peptit fraksiyonlarının ayrıştırılması ve saflaştırılmasında ise çeşitli membran ve kromatografik yöntemler ayrı ayrı ve/veya kombinasyonlar halinde kullanılmakta, elde edilen biyolojik aktiviteye sahip peptitlerin amino asit dizilimlerinin belirlenmesinde ise MS

teknolojisinden faydalanılmaktadır. Ayrıca bu alanda bilgisayar tabanlı ve analitik teknikleri içeren biyoinformatik araçlar proteinlerin amino asit dizilerine ulaşılması, enzim seçimi, in silico sindirim gerçekleştirilmesi, peptit karakterizasyonu ve olası biyoaktivite tahmininde araştırmacıların sıklıkla kullandığı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Biyoinformatik yaklaşım kapsamında, saflaştırılan peptit dizilerinin belirlenmesi ile kapsamlı biyoaktif peptit veri tabanları oluşturulmuştur. Bu veri tabanları sayesinde olası yeni peptitlerin tespiti mümkün olmaktadır. Peptitlerin sadece birincil yapılarının değil, üç boyutlu atomik yapılarının da aktivitelerinde önemli rolü bulunmaktadır ve peptit yapı-fonksiyon ilişkisini araştıran biyoinformatik çalışmalar bu anlamda çok önem taşımaktadır. Peptit atomik yapıları deneysel ve hesaplamalı yöntemlerle çözülebilmekte, elde edilen yapıların moleküler dinamik ya da docking gibi yöntemlerle analizi sonucu biyoaktiviteleri karakterize edilebilerek yeni nesil peptitler tasarlanabilmektedir. Ayrıca biyoinformatik analizlerle laboratuvar deneylerinin entegre edilmesi ve tümleşik bir yaklaşımla yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Biyoinformatik araçlar ile algoritmaların iyileştirilmesi ve geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır.

## Çıkar çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Benzerlik oranı (iThenticate): %7

## Kaynaklar

- [1] H. Kamal, C. F. Le, A. M. Salter and A. Ali, Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 2455-2475, 2021. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>
- [2] R. J. S. de Castro and H. H. Sato, Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 85-198, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.013>
- [3] D. Agyei, C. M. Ongkudon, C. Y. Wei, A. S. Chan and M. K. Danquah, Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
- [4] S. Chakrabarti, S. Guha and K. Majumder, Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. *Nutrients*, 10, 1738, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- [5] C. C. Udenigwe and R. E. Aluko, Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- [6] G. Shahidi and J. Zhong, Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914-931, 2008. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.914>

- [7] B. A. Kehinde and P. Sharma, Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 322-340, 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1528206>
- [8] M. Pojić, A. Mišan and B. Tiwari, Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 93–104, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>
- [9] M. Del Mar Contreras, A. Lama-Muñoz, J. M. Gutiérrez-Pérez, F. Espínola, M. Moya, E. Castro, Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459–77, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040>
- [10] Y. W. Sari, W. J. Mulder, J. P. M. Sanders and M. E. Bruins, Towards plant protein refinery: review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10, 1138–1157, 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201400569>
- [11] C. Wang, F. Xu, D. Li and M. Zhang, Physico-chemical and structural properties of four rice bran protein fractions based on the multiple solvent extraction method. *Czech Journal of Food Sciences*, 33 (3), 283-291, 2015. <https://doi.org/10.17221/462/2014-CJFS>
- [12] W. Wang, J. de Dios-Alché and M. I. Rodríguez-García, Characterization of olive seed storage proteins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 439-444. 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-007-0053-2>
- [13] D. J. Cookman and C. E. Glatz, Extraction of protein from distiller's grain. *Bioresource Technology*, 100, 2012-2017, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.059>
- [14] H. Yoshikawa, A. Hirano, T. Arakawa and K. Shiraki, Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 865-871, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.005>
- [15] C. Tanger, J. Engel and U. Kulozik, Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105949>
- [16] L. Shen, X. Wang, Z. Wang, Y. Wu and J. Chen, Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929-938, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.047>
- [17] Y. W. Sari, M. E. Bruins and J. P. M. Sanders, Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.014>
- [18] F. F. Shih, E. T. Champagne, K. Daigle and Z. Zarins, Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour, *Nahrung*, 43(1), 14-18, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19990101\)43:1<14::AID-FOOD14>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19990101)43:1<14::AID-FOOD14>3.0.CO;2-K)
- [19] S. Jung, B. P. Lamsal, V. Stepien, L. A. Johnson and P. A. Murphy, Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. *Journal of American Oil Chemists Society*, 83(1), 71-78, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1178-y>
- [20] J. Treimo, S. I. Aspino, V. G. H. Eijssink and S. J. Horn, Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5359-5365. 2008. <https://doi.org/10.1021/jf073317s>
- [21] K. Rommi, D. Ercili-Cura, T. K. Hakala, E. Nordlund, K. Poutanen and R. Lantto, Impact of total solid content and extraction pH on enzyme-aided recovery of protein from defatted rapeseed (*Brassica rapa* L.) press cake and physicochemical properties of the protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 2997-3003, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01077>
- [22] M. N. Perović, D. K. J. Zorica and G. A. Mirjana, Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction. *Journal of Food Engineering*, 276, 109894, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109894>
- [23] M. Herrero, A. Cifuentes and E. Ibañez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98, 136-148, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- [24] K. Watchararujij, M. Goto, M. Sasaki and A. Shotipruk, Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*, 99(14), 6207-6213, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.021>
- [25] I. Sereewatthanawut, S. Prapintip, K. Watchararujij, M. Goto, M. Sasaki and A. Shotipruk, Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99(3), 555–561, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.030>
- [26] M. A. Winters, B. L. Knutson, P. G. Debenedetti, H. G. Sparks, T. M. Przybycien, C. L. Stevenson and S. J. Prestrelski, Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 586–594, 1996. <https://doi.org/10.1021/js950482q>



- [27] S. Moshashaée, M. Bisrat, R. T. Forbes, H. Nyqvist and P. York, Supercritical fluid processing of proteins: I: Lysozyme precipitation from organic solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 239-245, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00108-1)
- [28] K. Li, H. Ma, S. Li, C. Zhang and C. Dai, Effect of ultrasound on alkali extraction protein from rice dreg flour. *Journal of Food Process Engineering*, 40, e12377, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12377>
- [29] A. A. Yagoub, H. Ma and C. Zhou, Ultrasonic-assisted extraction of protein from rapeseed (*Brassica napus* L.) meal: Optimization of extraction conditions and structural characteristics of the protein. *International Food Research Journal*, 24 (2), 621-629, 2017.
- [30] Y. Xu, Y. Li, T. Bao, X. Zheng, W. Chen and J. Wang, A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: Potential biological activities of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 221, 114-122, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.053>
- [31] K. E. Preece, N. Hooshyar, A. J. Krijgsman, P. J. Fryer and N. J. Zuidam, Intensification of protein extraction from soybean processing materials using hydrodynamic cavitation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 47-55, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.01.002>
- [32] H. W. Huang, C. P. Hsu, B. B. Yang and C. Y. Wang, Potential utility of high-pressure processing to address the risk of food allergen concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 78-90, 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12045>
- [33] K. Bandyopadhyay, C. Chakraborty and A. K. Barman, Effect of microwave and enzymatic treatment on the recovery of protein from Indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science*, 61(10), 525-529, 2012. <https://doi.org/10.5650/jos.61.525>
- [34] S. Phongthai, S. T. Lim and S. Rawdkuen, Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, 70, 146-154, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.001>
- [35] Y. Zhou, Q. He and D. Zhou, Optimization extraction of protein from mussel by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12962, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12962>
- [36] M. Li, J. Lin, J. Chen and T. Fang, Pulsed electric field-assisted enzymatic extraction of protein from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. *Journal of Food Process Engineering*, 39(6), 702-710, 2016. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12262>
- [37] P. E. Tham, Y. J. Ng, R. Sankaran, K. S. Khoo, K. W. Chew, Y. J. Yap, M. Malahubban, Z. Aziz, A. Fitri, P. L. Show and L. Pau, Recovery of protein from dairy milk waste product using alcohol-salt liquid biphasic flotation. *Processes*, 7(12), 1-18, 2019. <https://doi.org/10.3390/pr7120875>
- [38] K. X. Zhu, X. H. Sun and H. M. Zhou, Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.06.006>
- [39] Q. Zeng, Y. Wang, N. Li, X. Huang, X. Ding, X. Lin, S. Huang and X. Liu, Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid. *Talanta*, 116, 409-416, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.011>
- [40] K. Xu, Y. Wang, Y. Huang, N. Li and Q. Wen, A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta*, 864, 9-20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.026>
- [41] S. Piovesana, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, G. La Barbera, C. M. Montone, R. Zenezini R. Z. Chiozzi and A. Laganà, Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 3425-3444, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0852-x>
- [42] D. Montesano, M. Gallo, F. Blasi and L. Cossignani, Biopeptides from vegetable proteins: New scientific evidences. *Current Opinion in Food Science*, 31, 31-37, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.008>
- [43] Y. Hou, Z. Wu, Z. Dai, G. Wang and G. Wu, Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 24, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- [44] L. Liu, S. Li, J. Zheng, T. Bu, G. He and J. Wu, Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 199-207, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.022>
- [45] T. J. Ashaolu, Health applications of soy protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26 (4), 2333-2343, 2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14380>
- [46] M. A. Mazorra-Manzano, J. C. Ramírez-Suarez and R. Y. Yada, Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2147-2163(2018). <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308312>
- [47] J. M. Lorenzo, P. E. S. Munekata, B. Gómez, F. J. Barba, L. Mora, C. Pérez-Santaescolástica, and F.

- Toldrá, Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79, 136-147, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- [48] M. Karamać, A. Kosińska-Cagnazzo, A. Kulczyk, Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1027, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17071027>
- [49] W. Margatan, K. Ruud, Q. Wang, T. Markowski and B. Ismail, Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of soy protein subjected to selective hydrolysis and thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3460–3467, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf4001555>
- [50] A. B. Nongonierma, S. Le Maux, C. Dubrulle, C. Barre and R. J. Fitzgerald, Quinoa (*Chenopodium quinoa* wild.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Cereal Science*, 65, 112–8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.004>
- [51] R. Vilcacundo, C. Martínez-Villaluenga and B. Hernández-Ledesma Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- [52] C. Cavaliere, A. M. I. Montone, S. E. Aita, R. Capparelli, A. Cerrato, P. Cuomo, A. Laganà, C. M. Montone, S. Piovesana and A. L. Capriotti, Production and characterization of medium-sized and short antioxidant peptides from soy flour-simulated gastrointestinal hydrolysate. *Antioxidants*, 10, 734, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10050734>
- [53] Z. Shi, B. Dun, Z. Wei, C. Liu, J. Tian, G. Ren, Y. Yao, Peptides released from extruded adzuki bean protein through simulated gastrointestinal digestion exhibit anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(25), 7028-7036, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01712>
- [54] S. Keskin Ulug, F. Jahandideh and J. Wu, Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 27-39, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- [55] C. G. Rizzello, D. Tagliacruzchi, E. Babini, G. S. Rutella, D. L. Taneyo Saa and A. Gianotti, Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 2016, 549-569. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- [56] V. S. Vallabha and P. K. Tiku, Antihypertensive peptides derived from soy protein by fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, 161-168. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9377-5>
- [57] J. E. Aguilar-Toalá, L. Santiago-López, C. M. Peres, C. Peres, H. S. Garcia, B. Vallejo-Cordoba, A. F. González-Córdova and A. Hernández-Mendoza, Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>
- [58] R. Coda, C. G. Rizzello and M. Gobbetti, Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), *International Journal of Food Microbiology*, 137, 236-245, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.010>
- [59] J. S. Tsai, Y. S. Lin, B. S. Pan and T. J. Chen, Antihypertensive peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, 41(6), 1282-1288, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.026>
- [60] X. Wang, H. Yu, R. Xing and P. Li, Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International*, 2017 (9746720), 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>
- [61] L. Bazinet and L. Firdaous, Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides. *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 61-72, 2009. <https://doi.org/10.2174/187220809787172623>
- [62] Z. Chen, W. Li, R. K. Santhanam, C. Wang, X. Gao, Y. Chen, C. Wang, L. Xu, and H. Chen, Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [*Glycine max* (L.) merr.] byproduct: Isolation, identification and molecular docking study. *European Food Research and Technology*, 245(3), 677-689, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3190-5>
- [63] B. Y. Park and K. Y. Yoon, Biological activity of enzymatic hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions from perilla seed meal protein. *Czech Journal of Food Sciences*, 37, 180–185, 2019. <https://doi.org/10.17221/145/2018-CJFS>
- [64] M. M. Aondona, J. K. Ikya, M. T. Ukeyima, T. J. A. Gborigo, R. E. Aluko and A. T. Girgih, In vitro antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 45, e13587, 2021. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13587>

- [65] C. Acquah, Y. W. Chan, S. Pan, D. Agyei and C. C. Udenigwe, Structure-informed separation of bioactive peptides, *Journal of Food Biochemistry*, 43 (1), e12765, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12765>
- [66] E. Iritani, Y. Mukai and Y. Kiyotomo, Effects of electric field on dynamic behaviors of dead-end inclined and downward ultrafiltration of protein solution. *Journal of Membrane Science*, 164, 51-57, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00202-1)
- [67] G. Brisson, M. Britten and Y. Pouliot, Electrically-enhanced crossflow microfiltration for separation of lactoferrin from whey protein mixtures. *Journal of Membrane Science*, 297, 206-216, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.03.046>
- [68] A. Doyen C. C. Udenigwe P. L. Mitchell, A. Marette R. E. Aluko and L. Bazinet, Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 145, 66–76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.108>
- [69] C. Roblet, A. Doyen, J. Amiot, G. Pilon, A. Marette and L. Bazinet, Enhancement of glucose uptake in muscular cell by soybean charged peptides isolated by electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF): activation of the AMPK pathway. *Food Chemistry*, 147, 124–130, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.108>
- [70] R. He, A. T. Girgih, E. Rozoy, L. Bazinet, X. R. Ju and R.E. Aluko, Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 197, 1008–1014, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.081>
- [71] M. E. Langevin, C. Roblet, C. Moresoli, C. Ramassamy and L. Bazinet, Comparative application of pressure- and electrically-driven membrane processes for isolation of bioactive peptides from soy protein hydrolysate. *Journal of Membrane Science*, 403–404, 15–24, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.02.005>
- [72] G. Brusotti, E. Calleri, R. Colombo, G. Massolini, F. Rinaldi and C. Temporini, Advances on size exclusion chromatography and applications on the analysis of protein biopharmaceuticals and protein aggregates: a mini review. *Chromatographia*, 81, 3–23. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3380-5>
- [73] T. Y. Huang, L. M. Chi and K. Y. Chien, Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation. *Journal of Chromatography A*, 1571, 201–212, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.020>
- [74] C. Selkirk, Ion-exchange chromatography. In P. Cutler (Ed.), *Protein Purification Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed., Humana Press, pp. 125–131, Totowa, NJ, 2004.
- [75] C. Harscoat-Schiavo, F. Raminoso, E. Ronat-Heit, R. Vanderesse and I. Marc, Modeling the separation of small peptides by cation-exchange chromatography, *Journal of Separation Science*, 33(16), 2447-2457, 2010. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000112>
- [76] C. Singh, C. Sharma and P. Kamble Amino acid analysis using ion-exchange chromatography: a review. *International Journal of Pharmacognosy*, 1(12), 756-62, 2014.
- [77] S. Di Palma, M. L. Hennrich, A. J. R. Heck and S. Mohammed, Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis, *Journal of Proteomics*, 75(13), 3791-3813, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.033>
- [78] M. Barati, F. Javanmardi, S. M. H. M. Jazayeri, M. Masoumeh Jabbari, J. Jamal Rahmani, F. Farzaneh Barati, H. Hamid Nickho, S. H. Davoodi, N. Roshanravan and A. M. Khaneghah, Techniques, perspectives, and challenges of bioactive peptide generation: A comprehensive systematic review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1488-1520, 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12578>
- [79] M. Cermeño, T. Kleekayai, M. Amigo-Benavent, P. Harnedy-Rothwell and R. J. FitzGerald, Current knowledge on the extraction, purification, identification, and validation of bioactive peptides from seaweed. *Electrophoresis*, 41,1694–1717, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.033>
- [80] A. Ayala-Niño, G. M. Rodríguez-Serrano, L. G. González-Olivares, E. Contreras-López, P. Regal-López and A. Cepeda-Saez, Sequence identification of bioactive peptides from amaranth seed proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.). *Molecules*, 24, 3033, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24173033>
- [81] J. Yang, L. Hu, T. Tiantian Cai, Q. Qiuluan Chen, Q. Qian Ma, J. Jie Yang, C. Meng, J. Hong, Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (*Perilla frutescens* L. Britton) seed protein hydrolysates. *PloS One*, 13, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200021>
- [82] M. S. Coelho, S. de Araujo Aquino, J. M. Latorres and M. de las Mercedes Salas-Mellado, In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and

- peptides. *Food Hydrocolloids*, 91, 19-25, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.018>
- [83] C. Liu, D. Ren, J. Li, L. Fang, J. Wang, J. Liu and W. Min, Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fisch) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 42, 203-215, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.003>
- [84] Z. Karami, S. H. Peighambaroust, J. Hesari, B. Akbari-Adergani and D. Andreu, Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, 100450, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100450>
- [85] A. Connolly, M. O'Keeffe, A. Nongonierma, C. Piggott and R. FitzGerald, Isolation of peptides from a novel brewers spent grain protein isolate with potential to modulate glycaemic response. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1):146–53, 2017. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13260>
- [86] A. Kannan, N. S. Hettiarachchy, J. O. L. Lay and R. Iyanage, Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31(9), 1629-1634, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.05.018>
- [87] A. Wali, Y. Mijiti, G. Yanhua, A. Yili, H. A. Aisa and A. Kawuli, Isolation and Identification of a Novel Antioxidant Peptide from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Sprout Protein Hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 219–227, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10070-2>
- [88] C. Torres-Fuentes, M. Alaiz and J. Vioque, Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129(2), 485-490, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.103>
- [89] E. González-García, P. Puchalska, M. L. Marina and M. C. García, Fractionation and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from plum (*Prunus domestica* L.) Stones. *Journal of Functional Foods*, 19, 376-384, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.08.033>
- [90] R. Vásquez-Villanueva, L. Muñoz-Moreno, M. J. Carmena, M. L. Marina and M. C. García, In vitro antitumor and hypotensive activity of peptides from olive seeds. *Journal of Functional Foods*, 42, 177-184, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.062>
- [91] C. Megías, J. Pedroche, M. del Mar Yust, M. Alaiz, J. Girón-Calle, F. Millán and J. Vioque, Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 228–232, 2009. <https://doi.org/10.1021/jf061488b>
- [92] M. Zarei, A. Ebrahimpour, A. Abdul-Hamid, F. Anwar, F. A. Bakar, R. Philip and N. Saari, Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. *Food Research International*, 62, 726-734, 2014. <https://doi.org/10.3390/biom9100569>
- [93] T. Can, Introduction to Bioinformatics. In M. Yousef and J. Allmer (Eds.), *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, Springer Science+Business Media, pp. 51–71, 2014.
- [94] T. Madden, The BLAST Sequence Analysis Tool. In J. McEntyre and J. Ostell (Eds.), *The NCBI Handbook* Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), pp. 281, 2002.
- [95] G. Cochrane, I. Karsch-Mizrachi and T. Takagi, The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D48–D50, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1323>
- [96] S. Ötleş, B. Bakar and B. Kaplan Türköz, Bioinformatic Analysis. In L.M.L. Nollet and S. Ötleş (Eds.), *Bioactive Peptides from Food: Sources, Analysis, and Functions*, CRC Press, pp. 321-346, 2022.
- [97] A. Iwaniak, M. Darewicz, D. Mogut and P. Minkiewicz, Elucidation of the role of in silico methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. *Journal of Functional Foods*, 61, 103486, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103486>
- [98] A. Iwaniak, M. Darewicz and P. Minkiewicz, Databases of bioactive peptides. In F. Toldrá and J. Wu (Ed.), *Biologically Active Peptides From Basic Science to Applications for Human Health*, Academic Press, pp. 309–330, 2021.
- [99] P. Minkiewicz, A. Iwaniak and M. Darewicz, BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5978, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- [100] T. Panyayai, C. Ngamphiw, S. Tongsimma, W. Mhuanong, W. Limsripraphan, K. Choowongkamon and O. Sawatdichaikul, PeptideDB: A web application for new bioactive peptides from food protein. *Heliyon*, 5(7), e02076, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02076>
- [101] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics*

- Protocols Handbook, Humana Press, pp. 571–607, 2005.
- [102] C. Kartal, B. Kaplan Türköz and S. Otles, Prediction, identification and evaluation of bioactive peptides from tomato seed proteins using in silico approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1865–1883, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00434-z>
- [103] A. Peredo-Lovillo, A. Hernández-Mendoza, B. Vallejo-Cordoba and H. E. Romero-Luna, Conventional and in silico approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. *Food Chemistry: X*, 13, 100183, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100183>
- [104] A. Thomas, S. Deshayes, M. Decaffmeyer, M. H. Van Eyck, B. Charlotiaux and R. Bresseur, Prediction of peptide structure: How far are we?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(4), 889–897, 2006. <https://doi.org/10.1002/prot.21151>
- [105] R. K. Spencer and J. S. Nowick, A newcomer's guide to peptide crystallography. *Israel Journal of Chemistry*, 55(6-7), 698–710, 2015. <https://doi.org/10.1002/ijch.201400179>
- [106] F. Zhang, N. Adnani, E. Vazquez-Rivera, D. R. Braun, M. Tonelli, D. R. Andes and T. S. Bugni, Application of 3D NMR for Structure Determination of Peptide Natural Products. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(17), 8713–8719, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01486>
- [107] T. W. Gräwert and D. I. Svergun, Structural modeling using solution small-angle X-ray scattering (SAXS). *Journal of Molecular Biology*, 432(9), 3078–3092, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.030>
- [108] J. Verma, V. K. Coutinho and C. Evans, 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(1), 95–115, 2010. <https://doi.org/10.2174/156802610790232260>
- [109] A. B. Nongonierma and R. J. Fitzgerald, Learnings from quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: A review. *RSC Advances*, 6(79), 75400–75413, 2016. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- [110] S. Hellberg, M. Sjöström, B. Skagerberg and S. Wold, Peptide quantitative structure-activity relationships, a multivariate approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30(7), 1126–1135, 1987. <https://doi.org/10.1021/jm00390a003>
- [111] E. R. Collantes and W. J. Dunn, Amino acid side chain descriptors for quantitative structure-activity relationship studies of peptide analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(14), 2705–2713, 1995. <https://doi.org/10.1021/jm00014a022>
- [112] M. Sandberg, L. Eriksson, J. Jonsson, M. Sjöström and S. Wold, New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. a multivariate characterization of 87 amino acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(14), 2481–2491, 1998. <https://doi.org/10.1021/jm9700575>
- [113] F. Tian, Y. Lv and L. Yang, Structure-based prediction of protein–protein binding affinity with consideration of allosteric effect. *Amino Acids*, 43(2), 531–543, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1101-1>
- [114] E. Atilgan and J. Hu, Efficient protein-ligand docking using sustainable evolutionary algorithms. 2010 10th International Conference on Hybrid Intelligent Systems, HIS 2010, (pp.113–118), 2010. <https://doi.org/10.1109/HIS.2010.5600082>
- [115] H. Geng, F. Chen, J. Ye and F. Jiang, Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1162–1170, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.010>
- [116] Y. Zhang, A. N. Aryee and B. K. Simpson, Current role of in silico approaches for food enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 31, 63–70, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>

