

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

SOĞUK PRESLENMİŞ FINDIK POSALARINDAN
ENZİMATİK HİDROLİZLE OLUŞAN
PEPTİTLERİN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE GIDA ÜRÜNLERİNDE
UYGULANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Gülden GÖKSU

İstanbul
Şubat-2021

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

SOĞUK PRESLENMİŞ FINDIK POSALARINDAN
ENZİMATİK HİDROLİZLE OLUŞAN
PEPTİTLERİN BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE GIDA ÜRÜNLERİNDE
UYGULANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Gülden GÖKSU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

İstanbul
Şubat-2021

TEZ ONAYI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ali Güneş

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Soğuk Preslenmiş Fındık Posalarından Enzimatik Hidrolizle Oluşan Peptitlerin Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi ve Gıda Ürünlerinde Uygulanması**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Ayşe Gülden GÖKSU

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimimde bana yol göstererek destek olan ve çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında katkı sağlayan değerli danışmanım Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e teşekkür ve saygılarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarına bilgi ve birikimleri ile katkı sağlayan Biyokimyager Bilal ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Gıda Mühendisliği'ni seçmeme vesile olan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer Hocam Hüseyin Hüsnü GÜNDÜZ'e bana etik değerleri yaşayışıyla gösterdiği için minnetle teşekkürlerimi sunarım. Akademik ve sosyal hayatta örnek aldığım, desteğini, ilgisini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli Hocam Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU'na varlığıyla hayatıma güzellikler kattığı için teşekkür ederim. Tez jürimde bulunan ve değerli yorumları ile katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN'e teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında bana maddi manevi destek olan ve yoldaşlık yapan kıymetli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK 1001 Programı 217O063 numaralı proje kapsamında hazırlanan tezimde finansal desteği sağlayan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na, Acıbadem Üniversitesi Labmed'de gerçekleştirilen MS analizlerinde (hizmet alımı) teknik destekleri için Prof. Dr. Ahmet Tarık BAYKAL ve Emel AKGÜN'e teşekkür ederim.

Çok kıymetli bilim adamı, duruşuyla ve şahsiyetiyle rehber edindiğim, hayatıma anlam katan, ufku genişleten Hocam Dr. Zekeriya KÖKREK Beyefendi'ye kendisini tanıma fırsatını verdiği için teşekkür ederim.

Destekleriyle her zaman yanımda olan, sabırla ve anlayışla beni dinleyen, anlayan annem Nuran GÖKSU, babam Muharrem GÖKSU ve sevgili kardeşlerime teşekkür ederim.

Ayşe Gülden GÖKSU
İstanbul - 2021

ÖZET

**SOĞUK PRESLENMİŞ FINDIK POSALARINDAN
ENZİMATİK HİDROLİZLE OLUŞAN PEPTİTLERİN
BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
VE GIDA ÜRÜNLERİNDE UYGULANMASI**

Ayşe Gülden GÖKSU
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği
Tez danışmanı: Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN
Şubat-2021, 229 Sayfa

Bu çalışmada, yağ endüstrisi yan ürünü olan soğuk preslenmiş fındık (*Corylus avellane* L.) posası için potansiyel biyoaktif özelliklerin varlığı ve biyoaktif özellik gösteren bu bileşenlerin fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilirliği incelenmiştir. Çalışmanın amacı, fındık posası kullanılarak yenilikçi ve yüksek katma değerli peptit ürünlerinin üretilmesidir. Bu peptitlerin doğru teknolojik uygulamalarıyla hem insan sağlığına olumlu etkileri bulunan hem de alerjik özellikleri baskılanmış fındık bileşenleri üretilmesi hedeflenmektedir. Fındık posasından alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemiyle fındık proteini izolatları elde edilmiştir. İzolatların enzimatik hidrolizinde papain, bromelain ve pepsin enzimleri kullanılmıştır. Hidrolizatlar, FPLC (hızlı protein sıvı kromatografisi) sistemi ile peptit fraksiyonlarına ayrılmıştır. Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ve hidrolizatlara ait fraksiyonlara *in vitro* ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) önleyici aktivite testi, antidiyabetik aktivite testleri (DPP-IV (dipeptidil peptidaz-IV) önleyici aktivite testi, alfa-amilaz önleyici aktivite testi, alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi), asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi, antioksidatif aktivite testleri (DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi, demir şelasyon aktivitesi testi, FRAP (ferrik indirgeyici antioksidan gücü) yöntemi, hidroksil radikali tutma aktivitesi testi, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu) yöntemi, süperoksit anyon tutma aktivitesi) uygulanmıştır. ACE aktif peptitlerin tanımlanması amacıyla, ACE aktif fraksiyonlarının LC-Q-TOF/MS (sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi) analizi yapılmış ve *in silico* yöntemlerle özellikleri değerlendirilmiştir. ACE önleyici aktivite gösteren

peptit fraksiyonları yüksek miktarda toplanıp liyofilize edilerek kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerine ilave edilmiştir. Biyoaktif peptitler yönünden zenginleştirilmiş ürünlerin duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri, ilgili firma prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır. Hazırlanmış ürünlerde fındık proteini kaynaklı alerjik özellikler, ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Aktivitelerin insan vücuduna muhtemel etkilerini daha net ortaya koymak amacıyla, hazırlanmış ürünler simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden geçirilerek sindirilmiş fraksiyonlarda da biyoaktivite testleri yapılmıştır. Biyoaktivite testlerinde, farklı fraksiyonlar değişen oranlarda olmakla beraber testlerin tamamında etkinlik göstermiştir. ACE inhibitör peptitlerden PAF8, BRF3, PEF3, PEF6 fraksiyonu için IC_{50} (%50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değerleri sırasıyla 6,05 µg/ml, 20,79 µg/ml, 27,42 µg/ml, 1,97 µg/ml olarak hesaplanmıştır. DPP-IV inhibitör peptitlerden PAF2, BRF9 fraksiyonu için IC_{50} değerleri 5,58 µg/ml, 0,07 µg/ml olarak hesaplanmıştır. ACE aktif fraksiyonlarda 83 farklı peptit spektrumu bulunmuştur. Sırasıyla bromelain (FFFPGPKNK), papain (SEGFEWVAFK) ve pepsin (FMRWRDRFL) muamelesi ile oluşturulan peptitler, ACE ile üzerinde sırasıyla 16, 18 ve 17 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir. Sindirilmiş ürünlere yapılan testlerin sonuçları fraksiyonların kendisine yapılan testlerin sonuçlarıyla benzerlik göstermemiştir. Alerji testleri sonucunda ise, alerjik baskılamanın kısmen gerçekleştiği anlaşılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, fındık posasının başta ACE inhibitör peptitler olmak üzere farklı biyoaktif özellik gösteren peptitler açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini ve fındık posasının hidrolizatlarının fonksiyonel gıdaların, gıda takviyelerinin formülasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Fındık proteini, peptitlerin saflaştırılması, biyoaktif peptitler, ACE önleyici aktivite, DPP-IV önleyici aktivite, AChE önleyici aktivite, antioksidan aktivite, fonksiyonel gıdalar, *in silico* proteoliz.

ABSTRACT

**DETERMINATION OF BIOACTIVE PROPERTIES OF
PEPTIDES FROM COLD PRESSED HAZELNUT MEALS
BY ENZYMATIC HYDROLYSIS AND APPLICATIONS
IN FOOD PRODUCTS**

Ayşe Gülden GÖKSU
Master of Science, Food Engineering
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN
February-2021, 229 Pages

In this study, the existence of potential bioactive properties for cold-pressed hazelnut (*Corylus avellane* L.) meal, a by-product of the oil industry, and the usability of these bioactive components in functional food production were investigated. The study aims to produce innovative and high-value-added peptide products using hazelnut meals. With the correct technological applications of these peptides, it aims to produce hazelnut components with positive effects on human health and suppressed allergic properties. Hazelnut protein isolates were obtained from hazelnut meal by alkali extraction-isoelectric precipitation technique. Papain, bromelain, and pepsin enzymes were used in the enzymatic hydrolysis of isolates. Hydrolysates were separated into peptide fractions by the FPLC (fast protein liquid chromatography) system. *In vitro* ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory activity test, antidiabetic activity tests (DPP-IV (dipeptidyl peptidase-IV) inhibitory activity test, alpha-amylase inhibitory activity test, alpha-glucosidase inhibitory activity test), acetylcholinesterase inhibitory activity test, antioxidative activity tests (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, iron chelation activity test, FRAP (ferric reducing antioxidant power) method, hydroxyl radical scavenging activity test, ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) method, superoxide anion retention activity) were applied. To identify ACE active peptides, LC-Q-TOF/MS (liquid chromatography-flight time mass spectrometry) analysis of ACE active fractions was performed and their properties were evaluated by *in silico* techniques. Peptide fractions showing ACE inhibitory activity were collected in high amounts,

lyophilized, and added to the hazelnut spread with cocoa, and hazelnut paste with sugar products. The sensory, chemical, and microbiological analyses of the products enriched in bioactive peptides were made in accordance with the relevant company procedures. Allergic properties of hazelnut protein in the prepared products were determined by the ELISA method. To reveal the possible effects of the activities on the human body more clearly, the prepared products were simulated and bioactivity tests were performed on the digested fractions by passing through the gastrointestinal digestion. In bioactivity tests, different fractions were effective in all tests, albeit at varying rates. IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) values for ACE inhibitory peptides PAF8, BRF3, PEF3, PEF6 fractions were calculated as 6,05 $\mu\text{g/ml}$, 20,79 $\mu\text{g/ml}$, 27,42 $\mu\text{g/ml}$, 1,97 $\mu\text{g/ml}$, respectively. IC_{50} values for DPP-IV inhibitory peptides PAF2, BRF9 fraction were calculated as 5,58 $\mu\text{g/ml}$, 0,07 $\mu\text{g/ml}$. 83 different peptide spectra were found in ACE active fractions. Peptides generated by treatment of bromelain (FFFPGPNK), papain (SEGF EWVAFK), and pepsin (FMRWRDRFL), respectively, have 16, 18, and 17 possible binding points on ACE, respectively. The results of the tests on the digested products did not resemble the results of the tests on the fractions themselves. As a result of the allergy tests, it was understood that the allergic suppression was partial. This study showed that hazelnut meal can be considered an important source of peptides with different bioactive properties, especially ACE inhibitor peptides and that hydrolysates from hazelnut meal can be used in the formulation of functional foods and food supplements.

Key Words: Hazelnut protein, purification of peptides, bioactive peptides, ACE inhibitory activity, DPP-IV inhibitory activity, AChE inhibitory activity, antioxidant activity, functional foods, *in silico* proteolysis.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
KISALTMALAR	xx
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	
LİTERATÜR TARAMASI	8
2.1. Proteinler	8
2.1.1. Amino asitler ve peptitler.....	9
2.1.2. Alternatif protein kaynağı olarak yağlı tohum posaları	11
2.2. Biyoaktif peptitler	15
2.2.1. Biyoaktif peptitlerin üretimi.....	17
2.2.2. Biyoaktif peptitlerin konsantrasyonu ve saflaştırılması.....	19
2.2.3. Biyoaktif peptitlerin tanımlanması ve karakterizasyonu.....	25
2.2.4. Biyoaktif peptitlerin biyolojik fonksiyonellikleri	30
2.2.4.1. Antihipertansif peptitler	30
2.2.4.2. Antidiyabetik peptitler	36
2.2.4.3. Asetilkolinesteraz inhibitör peptitleri.....	37
2.2.4.4. Antioksidatif peptitler	39
2.2.5. Biyoaktif peptitlerin kullanımı	41
2.3. Fındık	45

2.3.1. Dünya fındık pazarı ve Türkiye	49
2.3.2. Fındık proteinleri ve peptitleri	52
2.3.3. Fındık proteinlerinin hidrolizinde kullanılan enzimler	54

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ..... 58

3.1. Materyaller	58
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	58
3.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar.....	59
3.2. Metotlar	60
3.2.1. Fındık posasının kompozisyon analizi	60
3.2.1.1. Protein analizi	61
3.2.1.2. Nem analizi	61
3.2.1.3. Kül analizi	61
3.2.2. Bitkisel posalardan protein izolatlarının elde edilmesi	62
3.2.3. Protein izolatlarının proteolitik hidrolizi.....	63
3.2.4. TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi	64
3.2.5. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması	65
3.2.6. Biyoaktivite testleri	69
3.2.6.1. ACE önleyici aktivite testi	69
3.2.6.2. Antidiyabetik aktivite testleri.....	70
3.2.6.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi	70
3.2.6.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi	71
3.2.6.2.3. Alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi	71
3.2.6.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi	72
3.2.6.4. Antioksidatif aktivite testleri.....	72
3.2.6.4.1. DPPH yöntemi	72
3.2.6.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi	73
3.2.6.4.3. FRAP yöntemi.....	73
3.2.6.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi	73
3.2.6.4.5. ABTS yöntemi	74
3.2.6.4.6. Süperoksit anyon tutma aktivitesi testi	74
3.2.7. Peptitlerin tanımlanması	75

3.2.7.1. LC-Q-TOF/MS analizi	75
3.2.7.2. <i>In silico</i> analizler	76
3.2.8. Gıda uygulamaları ve ürün analizleri.....	77
3.2.8.1. Kakaolu fındık kreması üretimi	78
3.2.8.2. Fındık ezmesi üretimi.....	80
3.2.8.3. Ürünlerin fabrika analizleri	82
3.2.8.4. Ürünlerin alerjenite testleri	84
3.2.8.5. Ürünlerin simüle edilmiş gastrointestinal sindirim testleri	84
3.2.8.6. Ürünlerin biyoaktivite testleri	87
3.2.9. İstatistiksel analiz	87

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA	88
4.1. Fındık posasının kompozisyon analizi	88
4.2. TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi	88
4.3. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması	91
4.4. Biyoaktivite testleri	96
4.4.1. ACE önleyici aktivite testi	96
4.4.2. Antidiyabetik aktivite testleri	107
4.4.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi	107
4.4.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi	114
4.4.2.3. Alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi	115
4.4.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi	117
4.4.4. Antioksidatif aktivite testleri.....	120
4.4.4.1. DPPH yöntemi	120
4.4.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi	122
4.4.4.3. FRAP yöntemi.....	124
4.4.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi	127
4.4.4.5. ABTS yöntemi	128
4.4.4.6. Süperoksit anyon tutma aktivitesi testi	130
4.5. ACE aktif fraksiyonların LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> yöntemlerle özelliklerinin değerlendirilmesi	132
4.6. Gıda uygulamalarının analizleri	148

4.6.1. Ürünlerin fabrika analizleri	148
4.6.2. Ürünlerin alerjenite testleri	150
4.6.3. Ürünlerin biyoaktivite testleri	150
4.6.3.1. ACE önleyici aktivite testi	151
4.6.3.2. Antidiyabetik aktivite testleri	152
4.6.3.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi	152
4.6.3.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi	152
4.6.3.2.3. Alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi	153
4.6.3.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi	153
4.6.3.4. Antioksidatif aktivite testleri	154
4.6.3.4.1. DPPH yöntemi	154
4.6.3.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi	155
4.6.3.4.3. FRAP yöntemi	156
4.6.3.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi	156
4.6.3.4.5. Süperoksit anyon tutma aktivitesi	157
SONUÇ	159
KAYNAKÇA	164
ÖZGEÇMİŞ	209

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.1.1: Amino asitler için isimlendirmeler ve standart semboller.....	10
Tablo 2.2.2.1: İyon değıştiricilerde kullanılan fonksiyonel gruplar.....	22
Tablo 2.2.3.1: Bitkisel kaynaklı proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitlerin farklı üretim, saflaştırma/ayırma, karakterizasyon metotları ve tanımlanan biyoaktif peptit özellikleri.....	28
Tablo 2.2.5.1: Farklı protein kaynaklarından enzimatik hidroliz ile üretilen biyoaktif peptitleri içeren ticari ürünler.....	42
Tablo 2.3.1: Türkiye’de yetişen farklı fındık (<i>Corylus avellana</i> L.) çeşitlerinin bileşim değerleri.....	48
Tablo 2.3.2: Fındık posasına ait standart değerleri	49
Tablo 2.3.1.1: 01/01/2019-31/12/2019 tarihleri arasında kayda alınan Türkiye fındık ihracatı.....	51
Tablo 4.1.1: Fındık posası ve fındık proteini izolatu için nem, kül, protein yüzdeleri.	88
Tablo 4.4.1.1: Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	98
Tablo 4.4.1.2: Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	100
Tablo 4.4.1.3: Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	101
Tablo 4.4.1.4: Kaptopril’e ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	102
Tablo 4.4.2.1.1: Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri.....	108

Tablo 4.4.2.1.2: Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri.....	109
Tablo 4.4.2.1.3: Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri.....	111
Tablo 4.5.1: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi	135
Tablo 4.5.2: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi	136
Tablo 4.5.3: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi	137
Tablo 4.5.4: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi	138
Tablo 4.5.5: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	139
Tablo 4.5.6: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	140
Tablo 4.5.7: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda pepsin muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	141
Tablo 4.5.8: LC-Q-TOF/MS analizi ve <i>in silico</i> analizler sonucunda pepsin muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.....	142

Tablo 4.5.9: FFFPGPNK peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	144
Tablo 4.5.10: SEGFEWVAFK peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	145
Tablo 4.5.11: FMRWRDRFL peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi.....	146
Tablo 4.5.12: Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması	147
Tablo 4.6.1.1: Mikrobiyolojik ekim sonuçları	149
Tablo 4.6.2.1: Alerjen testi örnekleri ve alerjen madde miktarı (mg/kg)	150
Tablo 4.6.3.1.1: Ürünlerin % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	151
Tablo 4.6.3.2.1.1: Ürünlerin % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri.....	152
Tablo 4.6.3.2.2.1: Ürünlerin % alfa-amilaz önleyici aktivite değerleri	153
Tablo 4.6.3.2.3.1: Ürünlerin % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri.....	153
Tablo 4.6.3.3.1: Ürünlerin % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerleri.....	154
Tablo 4.6.3.4.1.1: Ürünlerin % DPPH süpürme aktivitesi değerleri	155
Tablo 4.6.3.4.2.1: Ürünlerin % demir şelasyon aktivitesi değerleri	155
Tablo 4.6.3.4.3.1: Ürünlerin % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri.....	156
Tablo 4.6.3.4.4.1: Ürünlerin % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri	157
Tablo 4.6.3.4.5.1: Ürünlerin % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerleri	157

ŞEKİLLER LİSTESİ

İKİNCİ BÖLÜM

Şekil 2.1: Autodock 4.2 ile gösterilen ACE'nin kristal yapısı	30
Şekil 2.2: Farklı fındık türleri	46
Şekil 2.3: Tombul fındık fiziksel görünümü	47

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Şekil 3.1: Soğuk preslenmiş fındık posası	60
Şekil 3.2: Kül fırınında ve kül fırınından çıktıktan sonra örnekler	61
Şekil 3.3: Dondurulmuş numunelerin liyofilizasyonu	62
Şekil 3.4: Santrifüjden çıkan tüplerdeki katı kısmın petriye yayılması, dondurulması, liyofilize edilmesi ve liyofilizatörden alınan kurumuş protein izolatlarının toz forma getirilmesi.....	63
Şekil 3.5: FPLC sistemi akış yolu	65
Şekil 3.6: FPLC sistemine ait 1 ml'lik ve 5 ml'lik kolonlar ve hidrolizat numunelerinin sisteme enjekte edilmesi.....	66
Şekil 3.7: FPLC sisteminde fraksiyonlama metodunun kurulması.....	67
Şekil 3.8: FPLC sisteminde uygun metot ile fraksiyon toplayıcıda fraksiyonların falkon tüplere toplanması.....	68
Şekil 3.9: HPLC sisteminde fraksiyonların ayarlanan metot ile ACE önleyici aktivite testlerinin çalışılması.....	70
Şekil 3.10: FİSKOBİRLİK tesislerinde değerlendirilen örneklerin liyofilize edilmesi	78

Şekil 3.11: Kakaolu fındık kreması üretim akış şeması.....	79
Şekil 3.12: Manuel konçlama esnasında ürünün fiziksel ve tekstürel değişimi.....	80
Şekil 3.13: Fındık ezmesi üretim akış şeması	81
Şekil 3.14: Pres aleti ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı	83
Şekil 3.15: Aflatoksin analizinde kullanılan HPLC sistemi.....	83
Şekil 3.16: Ürünlerin sindirim testlerinin yapılması	85
Şekil 3.17: Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden geçirilmesi	86
Şekil 3.18: Ürünlerin sindirim öncesi ve sindirim sonrası görünümü	86

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Şekil 4.1: Farklı hidrolizatlarda TNBS yöntemi ile %DH değerlerinin değişimi	89
Şekil 4.2: L-Lösin standardı kalibrasyon grafiği.....	89
Şekil 4.3: Enzimlerin fındık proteini izolatu için % hidroliz dereceleri	90
Şekil 4.4: Papain ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri.....	93
Şekil 4.5: Bromelain ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri.....	94
Şekil 4.6: Pepsin ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri.....	95
Şekil 4.7: Negatif ve pozitif kontrole göre peptit fraksiyonu HA alanı	97
Şekil 4.8: Hippürik asit kalibrasyon eğrisi.....	97
Şekil 4.9: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının HA alanları	98
Şekil 4.10: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri	99

Şekil 4.11: Bromelain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri	100
Şekil 4.12: Pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri	102
Şekil 4.13: Kaptopril (pozitif kontrol) için farklı konsantrasyonlardaki hippürik asit alanları.....	103
Şekil 4.14: Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri.....	104
Şekil 4.15: Pozitif kontrol numunesi (Kaptopril) için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	105
Şekil 4.16: Pozitif kontrol ve en yüksek ACE önleyici aktiviteye sahip fraksiyonların IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması	106
Şekil 4.17: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri	109
Şekil 4.18: Bromelain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri	110
Şekil 4.19: Pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri	111
Şekil 4.20: Pozitif kontrol numunesi (Diprotin A) için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	112
Şekil 4.21: Pozitif kontrol ve en yüksek DPP-IV önleyici aktiviteye sahip fraksiyonların IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.....	113
Şekil 4.22: Farklı örneklerde % alfa-amilaz önleyici aktivite değerlerinin değişimi	114
Şekil 4.23: Farklı örneklerde % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerlerinin değişimi	115

Şekil 4.24: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri.....	117
Şekil 4.25: Farklı örneklerde % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerlerinin değişimi.....	118
Şekil 4.26: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi değerleri.....	119
Şekil 4.27: Farklı örneklerde % DPPH süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi...	121
Şekil 4.28: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri.....	122
Şekil 4.29: Farklı örneklerde % demir şelasyon aktivitesi değerlerinin değişimi....	123
Şekil 4.30: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir şelasyon aktivitesi değerleri.....	124
Şekil 4.31: Farklı örneklerde % demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi değerlerinin değişimi.....	125
Şekil 4.32: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi değerleri.....	126
Şekil 4.33: Farklı örneklerde % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerlerinin değişimi.....	127
Şekil 4.34: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri.....	128
Şekil 4.35: Farklı örneklerde % ABTS süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi...	129

Şekil 4.36: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri.....	130
Şekil 4.37: Farklı örneklerde % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerlerinin değişimi	131
Şekil 4.38: PAF3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri	133
Şekil 4.39: Bromelain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FFFPGPNK peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi	143
Şekil 4.40: Papain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan kısa peptidin (≤ 10 amino asit, SEGFEWVAFK) ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi	144
Şekil 4.41: Pepsin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FMRWRDRFL peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi	145

KISALTMALAR

m	: Mili
μ	: Mikro
n	: Nano
k	: Kilo
g	: Gram
l	: Litre
Da	: Dalton
M	: Molar
N	: Normal
U	: Ünite
pH	: Hidrojen İyonu Gücü (Power of Hydrogen)
ABS	: Absorbans
AOAC	: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (Association of Official Analytical Chemists)
EC	: Enzim Komisyonu
GTB	: Giresun Ticaret Borsası
INC	: Uluslararası Kabuklu Yemiş ve Kuru Meyve Konseyi (International Nut & Dried Fruit Council)
KİB	: Karadeniz İhracatçılar Birliği
TMO	: Toprak Mahsulleri Ofisi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Ziraat Dairesi (United States Department of Agriculture)
NMKL	: Gıda Analizleri Alanında İskandinav Ülkeleri Birliği (Nordic Committee on Food Analysis)
TS EN ISO	: Türk Standardı Avrupa Normu Uluslararası Standartlar Örgütü
FİSKOBİRLİK	: Fındık Tarım Satış Kooperatifleri Birliği
örn.	: örneğin
vb.	: ve benzeri
vd.	: ve diğerleri

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Günümüz toplumlarının sosyoekonomik yapılarına paralel olarak, ülkemiz nüfusunun sürekli artan bir bölümü daha stresli ve yoğun bir iş hayatı geçirmektedir. Bunun doğal sonucu olarak ilgili bireyler günlük diyetlerine daha az özen gösterebilmekte, kalori açısından zengin ancak besleyicilik yönünden zayıf besinler tüketmekte ve özellikle ofis çalışanlarında, egzersiz eksikliğinin de etkisiyle önemli sağlık sorunları baş göstermektedir. Vücut ağırlığı fazlalığı, kalp hastalıkları ve kanser vakalarındaki gözle görülür düzeyde artışlar kısmen bu durumların etkisiyle oluşmaktadır. Bu problemler, ülkemiz vatandaşlarının genel refah düzeyini düşürmektedir. Bu gelişmeler aynı zamanda sosyal güvenlik sistemlerimizin gelecekte yaşayabileceği bazı temel sıkıntıların da kaynağını oluşturmaktadır. Bu bağlamda, fonksiyonel gıda ürünleri önem kazanmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, kalori içeriğine ek olarak tüketici ve dolayısıyla toplum sağlığını olumlu yönde etkileme potansiyeli bulunan gıda ürünleridir.

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında birinci ölüm nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2020), her yıl, tahmini 17,9 milyon insanın, dünya çapında ölümlerin yaklaşık %31'ini oluşturan kardiyovasküler hastalıklar dolayısıyla hayatını kaybettiğini bildirmektedir. Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların gelişmesine neden olan bir halk sağlığı sorunudur ve komplikasyonları arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, koroner kalp hastalığı, felç, kalp yetmezliği, kalp ritmi düzensizlikleri ve böbrek yetmezliği bulunur (Stokes vd., 1989). Dünya nüfusunun %25'inden fazlasının (1 milyardan fazla) 2000 yılında hipertansiyondan etkilendiği, bu sayının 2025 yılına kadar 1,56 milyar seviyesine çıkacağı tahmin edilmektedir (Kearney vd., 2005). Türkiye’de 2017 ve 2018 yılındaki ölüm nedenleri içinde dolaşım sistemi hastalıkları ilk sırada yer almaktadır (TÜİK, 2020). İlk geliştirilen sentetik ilaç olan kaptopril, oral olarak aktif anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin prototipi olarak kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir gelişmeyi temsil etmiştir. Bu süreçleri inhibe ederek, kaptopril, enalapril, alacepril, lisinopril ve ramipril gibi

sentetik anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE, EC 3.4.15.1) inhibitörleri, insanlarda hipertansiyon ve kalp yetmezliğinin etkili klinik tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Boye vd., 2010). Bununla birlikte, bu sentetik ilaçların ishal, öksürük, alerji, tat bozuklukları, deri döküntüleri, böbrek fonksiyon bozukluğu ve bazı durumlarda hipotansiyon gibi çeşitli yan etkileri vardır (Tenenbaum vd., 2000). Bu nedenle, doğal ACE inhibitörlerinin sentetik olanlara alternatif olarak araştırılması, bunların farmasötik olarak güvenli ve ekonomik olarak kullanılması önemli bir araştırma alanıdır. Bu nedenle, alternatif ilaçlar olarak daha güvenli doğal gıda kaynaklarından yeni ACE inhibitörlerinin araştırılması büyük araştırma ilgisini çekmektedir. ACE inhibitörü biyoaktivitesinin araştırılması, biyoaktif peptitlerin literatüründe en sık çalışılan alanlardan biridir (Lee ve Hur, 2017). “ACE inhibitörü” veya “antihipertansif peptit” teriminin kullanımı, peptidin *in vitro* ve/veya *in vivo* aktivitesi ile ilgilidir (Suetsuna ve Chen, 2001).

Diyabet (“*Diabetes mellitus*”, DM), kan şekeri seviyesinde sürekli bir artış ile karakterize bir grup kronik metabolik bozukluk veya hastalıktır. İyi tedavi edilmezse çeşitli organları (kalp, damarlar, böbrek, nöron, göz) etkileyebilir ve hayatı tehdit eden çeşitli komplikasyonlara, hatta ölüme yol açabilir (Mirmiran, Bahadoran ve Azizi, 2014). Diyabet insidansı tüm dünyada önemli ölçüde artmaktadır ve Uluslararası Diyabetik Federasyonu (“International Diabetes Federation”, IDF), 2035 yılına kadar kabaca 592 milyon insanın diyabetten etkilenebileceğini öngörmüştür (Guariguata vd., 2014). Artan kentleşme, yaşlanma, yaşam tarzı şekli (egzersiz ve farkındalık eksikliği, sigara içme) obezite ile sonuçlanır. Böylece gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet prevalansı artar (Deshpande, Harris-Hayes ve Schootman, 2008). Diyabet hastaları için sağlık hizmetlerinin maliyeti, hastaneye yatış/konsültasyonun yanı sıra ekonomik bir yük oluşturan çeşitli tedavi prosedürleri (bariatrik ameliyatlar, ilaçlar ve insülin) nedeniyle büyük ölçüde artmaktadır (WHO, 2016). Tip 1 diyabet (insüline bağımlı) ve Tip 2 diyabet (insülininden bağımsız) olmak üzere iki ana tip diyabet bulunur. Tip 1 diyabet, epigenetik (otoimmünite/mutasyon) veya sonradan gelişen bir durum olarak pankreasın β hücrelerinin tamamen tahrip olması nedeniyle insülin üretiminde mutlak bir eksiklik ile karakterizedir. Tip 1 diyabet, tüm yaşı etkileyen tüm diyabet vakalarının sadece %10'unu temsil eder, ancak bu grubun çoğunluğu 5 yaşından küçük çocuklardır (Atkinson, Eisenbarth ve Michels, 2014; Ozougwu vd., 2013). Tip 2 diyabet, diyabet vakalarının %90'ını oluşturan

yaygın bir diyabet türüdür, ayrıca insülin sekresyonunda (bozulmuş hücre fonksiyonu) veya reseptöründe (insülin direnci) kusur nedeniyle kan şekeri seviyesinde (kronik hiperglisemi) uzun süreli artış ile karakterizedir (Li vd., 2019). Amerikan Diyabet Derneği ve Avrupa Diyabet Araştırmaları Derneği'nin kılavuzları, potansiyel bir birinci basamak ajan olarak veya diğer anti-hiperglisemik ilaçlarla kombinasyon hâlinde α -amilaz ve α -glukosidaz inhibitörlerinin kullanılmasını önermektedir (Zhang vd., 2018).

Alzheimer hastalığı, bazal ön beyin kolinerjik nöronlarının kaybı ve nörotransmitter asetilkolin (ACh) seviyesinin azalması ile karakterize kronik bir nörodejeneratif hastalıktır (Alzheimer Derneği, 2014). Alzheimer, 65 yaşın üzerindeki insanların %5'ini, 80 yaşın üzerindeki insanların %20'sini etkiler ve bu hastalığın, özellikle dünyadaki gelişmiş ülkelerde, yaşam beklentisinin artmasına bağlı olarak tedavi edilmesinin önemi artmaktadır. Özellikle, tahminler 2005 ile 2010 yılları arasında sırasıyla 27,7 ile 35 milyon kişinin bu hastalıktan etkilendiğini göstermektedir. Aynı çalışmada, tedavi maliyetlerinin 156 milyar dolardan 604 milyara yükseldiği tespit edilmiştir (Wimo, Winblad ve Jönsson, 2007; Wimo vd., 2013). WHO, dünya çapında Alzheimer hastalığı prevalansının 2050 yılına kadar yaklaşık 114 milyona ulaşacağını tahmin etmiştir (Alzheimer Derneği, 2018). Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) inhibitörleri, Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. AChE inhibitörleri olarak kullanılan ilaçlar arasında takrin, rivastigmin ve donepezil bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçların bulantı, kusma ve ishal gibi bazı yan etkileri vardır (Wang vd., 2009).

Bozulmuş glikoz metabolizması Alzheimer hastalığı gelişimi ile yakından bağlantılıdır ve bazı araştırmacılar Alzheimer hastalığını Tip 3 diyabet olarak adlandırır (Hayes, 2014). Ayrıca Tip 2 diyabet, Alzheimer hastalığı gelişimi için ek bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Kroner, 2009). Bu nedenle, Tip 2 diyabet gelişiminde önemli olduğu düşünülen, dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) gibi enzimlerin inhibisyonunun, Alzheimer hastalığı ve diğer psikiyatrik bozukluklarının gelişimi üzerinde etkileri olabilir. Glukagon benzeri peptit-1 seviyesini arttıran ve Tip 2 diyabeti iyileştiren DPP-IV inhibitörleri gibi farmakolojik ajanlar, Alzheimer hastalığı tedavisinde hastalık modifiye edici ajanlar olarak değerli adaylar hâline gelmiştir.

Bütillenmiş hidroksilanisol, bütillenmiş hidroksiltoluen, propil gallat ve tert-bütillhidrokinon gibi sentetik antioksidanların, güçlü antioksidan aktiviteleri nedeniyle gıda sistemlerinde yaygın olarak kullanılmalarına rağmen gıda kaynaklı antioksidanlarla karşılaştırıldığında, olası *in vivo* toksisiteden kaynaklanan potansiyel sağlık riskleri nedeniyle katı düzenlemeler altında kullanılmaları gerekmektedir (Sarmadi ve Ismail, 2010). Tokoferoller gibi doğal antioksidanların düşük etkinliği, yüksek üretim maliyetleri ve tüketicilerin gıda katkı maddesi güvenliği konusundaki artan bilinciyle birlikte alternatif doğal ve muhtemelen daha güvenli gıda antioksidan kaynaklarının tanımlanmasına ihtiyaç duyulmuştur (Pihlanto, 2006). Doğal gıda kaynaklarından türetilen peptitler, düşük moleküler ağırlıkları, yüksek aktivite, kolay emilim ve kandan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması nedeniyle olumsuz yan etkilerin az olması veya hiç olmaması ile ilişkili olarak kullanım açısından avantajlıdır (Sarmadi ve Ismail, 2010).

Herhangi bir ilacın uzun süreli kullanımının sağlıkta bozulmaya yol açabilecek, dolayısıyla sağlık maliyetlerinde artışa neden olabilecek kendi olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle, biyoaktif peptitleri içeren doğal gıda kaynakları, hastalıkların önlenmesine, sağlık hizmet maliyetlerinin küresel olarak azaltılmasına ve ilaç tedavisine bağımlılığın azaltılmasına önemli ölçüde yardımcı olabilir (Girgih vd., 2014). Çalışmalar, fizyolojik yararları olan biyoaktif peptitlerin uygulanmasını içeren fonksiyonel gıdaların ve nutrasötiklerin geliştirilmesine odaklanmaktadır (Cheung, Ng ve Wong, 2015). Gıda proteinleri, iki kriter temelinde biyoaktif peptit kaynağı olarak seçilir. Bunlardan birincisi, bol miktarda bulunan ama az kullanılan proteinlerin veya protein açısından zengin gıda endüstrisi yan ürünlerinin katma değerli kullanımının araştırılması, ikincisi farmakolojik açıdan ilgilenilen spesifik peptit sekansları veya amino asit kalıntıları içeren proteinlerin kullanılmasıdır (Udenigwe ve Aluko 2011). Bu bağlamda, biyoaktif peptitlerin çeşitli gıda ürünlerine katılarak ve planlanan koruyucu/önleyici sağlık fonksiyonlarını sağlamak için fizyolojik olarak kullanılabilir hâle getirilerek ticari kullanımının arttırılması gerekmektedir.

Ülkemiz, gıda katkı maddeleri ile teknolojik ve biyolojik yararlılık gösteren fonksiyonel gıda bileşenleri alanlarında net bir ithalatçı statüsündedir. Gıda endüstrimizde ortaya yan ürün olarak çıkan ürünlerimiz (örn., bitkisel posalar) çoğu zaman yabancı üreticiler tarafından satın alınmakta ve işlendikten sonra katma değerli

ürünler olarak ülkemize geri satılmaktadır. Özellikle, bitkilerden elde edilen proteinler, hem piyasa fiyatı hem de çevresel etki açısından hayvansal proteinlerden daha az maliyetlidir ve 1 kg hayvansal protein üretmek için yem olarak 4,9 kg bitkisel proteine ihtiyaç duyulduğu tahmin edilmektedir (Gueguen, Walrand ve Bourgeois, 2016). Ulusal dış ticaret açığımızı dengeleme hususunda gıda ve gıda bileşenleri endüstrilerimize düşen başlıca görevlerden biri, katma değeri düşük kaynaklarımızın, endüstriyel yan ürün ve atıklarımızın katma değerli ürünlere çevrilmesi yoluyla sürdürülebilirliği olan ve özellikle ihraç kapasitemizi geliştirecek bir gıda bileşenleri sektörü oluşturulmasıdır. Dolayısıyla, biyolojik ve teknik anlamda fonksiyonellik gösteren yenilikçi ürünlere ihtiyaç bulunmaktadır. Ülkemizdeki zirai çeşitlilik göz önüne alınarak güçlü bir gıda bileşenleri endüstrisi oluşturulması ve buna bağlı olarak kısa vadede ithalatın önüne geçilmesi, orta vadede ise net bir ihracatçı olunması mümkün görünmektedir. Dolayısıyla sağlığı olumlu etkileyecek gıdaların üretimi, bu ürünler için fonksiyonel bileşenler geliştirilmesi ve bu bileşenlerin ihracı yoluyla toplumsal ekonomiye katkı yapılması hususları birbirini destekleyen bir döngü oluşturmaktadır. Bu bağlamda, çalışmada yağ endüstrisi yan ürünü olan soğuk preslenmiş fındık (*Corylus avellane* L.) posası için potansiyel biyoaktif özelliklerin varlığı ve biyoaktif özellik gösteren bu bileşenlerin fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilirliği incelenmiştir.

Gülseren (2018), çalışmasında 3 gastrointestinal (pepsin, tripsin, kimotripsin) ve üç gastrointestinal olmayan enzim (papain, bromelain, termolisin) kullanarak fındık (*Corylus avellana* L.) peptitlerinin biyolojik fonksiyonelliğini değerlendirmek için *in silico* yöntemlerle analiz çalışması yapmıştır. Farklı proteazlarla parçalanan 23 fındık proteininin biyoaktif olma olasılığı %50'den büyük olan peptitlerinin sayısı belirlenmiştir. Çoğu durumda tripsin, pepsin, kimotripsin gibi gastrointestinal proteazlar, farklı kaynaklardan üretilen termolisin, papain ve bromelain gibi proteazlara nispeten daha düşük miktarlarda biyoaktif peptit üretmektedirler. Bununla birlikte, çoğu durumda üretilmesi muhtemel biyoaktif peptitlerin % yoğunluğu birçok süt ve buğday proteini ile tahıllarda bulunan RUBISCO enzimlerine (Udenigwe, Gong ve Wu, 2013) göre belirgin ölçüde yüksektir (Gülseren, 2018). Bu bulgular, fındık proteinlerinin en azından teorik olarak biyoaktif olma olasılığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada ayrıca fındık proteinlerinde gözlenecek en muhtemel biyoaktivitelerin ACE ve DPP-IV önleyici aktiviteler olduğu, bu aktiviteler kadar sıklıkla rastlanmasa da

findık proteinlerinin antioksidatif etkileri de olabileceği öngörülmüştür. Bu bulgular göz önüne alınarak, *in vitro* başka bir çalışma yapılmıştır (Gülseren ve Çakır, 2019). Soğuk pres yönteminde ortaya çıkan findık (*Corylus avellana* L.) posalarından, findık proteini konsantreleri üretilmiş ve bu konsantreler triptik hidrolize (37°C) tabi tutulmuştur. Tripsinoliz prosesi, boyutsal ayırım kromatografisi (“size exclusion chromatography”, SEC), hızlı protein sıvı kromatografisi (“fast protein liquid chromatography”, FPLC) ve Raman spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir. Enzimatik muamele görmemiş protein konsantrelerinin sınırlı ACE inhibe edici aktivitesi varken, 240 dakikalık tripsinolizde oluşan peptitlerin ACE inhibitör aktivitesi, düşük protein konsantrasyonlarında dahi yaklaşık %40 düzeyinde gerçekleşmiştir. Belirli koşullar altında (sabit sıcaklık, pH, iyonik yoğunluk, substrat:enzim oranı) hazırlanan hidrolizatların değişen oranlarda (%10-40) ACE önleyici aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Tepkime zamanı arttıkça inhibisyonun artması, dolayısıyla, farklı enzimler ve tepkime koşulları kullanılarak findık proteinlerinin biyoaktivitelerinin iyileştirilmesi beklenmektedir. Mevcut bulgular, findık posasının ACE inhibitör peptitler açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini ve findık posasından elde edilen hidrolizatların fonksiyonel gıdaların ve gıda takviyelerinin formülasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada, sırasıyla soğuk preslenmiş findık posasından findık proteini izolatları, izolatlardan enzimatik yöntemlerle (papain, bromelain, pepsin) hidrolizatlar ve hidrolizatlara ait fraksiyonlar elde edilmiştir. Bu hidrolizatlar ve hidrolizatlara ait fraksiyonlara *in vitro* ACE önleyici aktivite testi, antidiyabetik aktivite testleri (DPP-IV önleyici aktivite testi, alfa-amilaz önleyici aktivite testi, alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi), asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi, antioksidatif aktivite testleri (DPPH yöntemi, demir şelasyon aktivitesi testi, FRAP yöntemi, hidroksil radikali tutma aktivitesi testi, ABTS yöntemi, süperoksit anyon tutma aktivitesi) uygulanmıştır. ACE önleyici aktivite gösteren peptitlerin tanımlanması amacıyla ACE aktif fraksiyonlarının LC-Q-TOF/MS analizi yapılmış ve *in silico* yöntemlerle özellikleri değerlendirilmiştir. ACE önleyici aktivite gösteren peptit fraksiyonları yüksek miktarda toplanarak liyofilize edilmiş ve ürünlere (kakaolu findık kreması ve findık ezmesi) ilave edilmiştir. Ürünlere duyuusal, kimyasal, mikrobiyolojik analizler ve findık proteini kaynaklı alerjik özellikleri tespit etmek amacıyla ELISA testi yapılmıştır. Ürünler simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden geçirilmiş,

fraksiyonlara uygulanan testler sindirilmiş fraksiyonlara da yapılmıştır. Fındık posasından üretilen biyoaktif peptitlerin fonksiyonel bir gıda ürünü için potansiyel kullanımının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.



İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Proteinler

Proteinler, tüm biyokimyasal olayların temeli olarak büyük fizyolojik öneme sahip olan gıda bileşenleridir. Bitkiler, proteinleri havadan ve topraktan aldıkları karbondioksit, su ve nitratlardan, kükürtlü ve fosforlu anorganik bileşiklerden köklerinde veya fotosentez yoluyla ışık etkisinde yapraklarında sentezlerler. Bitkilerin yaprak, sap, kök ve yumrularında az miktarda protein bulunmasına karşın tohumlarında protein içeriği yüksektir (Demirci, 2012).

Proteinler, çeşitli sayıda ve değişik amino asitlerin birleşmesiyle oluşan, molekül ağırlıkları büyük, uzun zincirli ve amfoter karakterli biyopolimer yapıda bileşenlerdir. Proteinler, nişasta, selüloz gibi büyük moleküler ağırlıklı kolloidler sınıfına dâhil edilir. Proteinlerin her birinin üç boyutlu yapısı ve kendine özgü biyolojik nitelikleri vardır. Bu yapı ve nitelikleri ise polimer zincirini meydana getiren monomer birimlerinin, dolayısıyla amino asitlerinin türleriyle, sayılarıyla ve diziliş sırasıyla sağlanır. Atomların ve atom gruplarının konfigürasyonlarının ortaya getirdiği biçimlenmelerin toplamı, molekülün üç boyutlu yapısının oluşumunu sağlar. Proteinlerin büyüklüğünden ayrı olarak protein molekülünün karakteristik 3 boyutlu yapısını ifade eden korformasyon (biçimlenme) sayesinde, proteinler çeşitli fizikokimyasal özellikler kazanır ve biyolojik fonksiyonlarını yerine getirir (Ustunol, 2015). Proteinlerin konformasyonu, kovalent bağları kırılmaksızın üç boyutlu boşluk içerisinde çok değişik pozisyonlarda bükülme, kıvrılma ve böylece farklı pozisyonlar alma ile oluşan yapısal bir durumdur. Proteinlerin karakteristik üç boyutlu yapılarının oluşumundan primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuarterner (dördüncül) olarak tanımlanan üç farklı yapı sorumludur (Ustunol, 2015).

Proteinler, çok değişik özellikte olmalarına rağmen, birçok amino asidin peptit bağları ile bağlanmaları sonucu oluşur. Dolayısıyla, proteinlerin özelliklerini açıklayabilmek için protein yapıtaşları olan amino asitlerin özelliklerini bilmek gerekir (Demirci, 2012).

2.1.1. Amino asitler ve peptitler

Amino asitler, monokarboksilli organik asitlerin karbon zincirindeki metil grubu hidrojenlerinden birinin yerine amin grubunun gelmesiyle oluşan organik bileşikleridir. Proteinlerin yapısında sadece, karboksil ve amino grubunun aynı karbon atomuna bağlanmasıyla oluşan α -amino asitler vardır. α -amino asitler birbirinden farklı R grupları (amino asitlerdeki değişken grup) ile ayrılırlar. R grubu hidrojen, uzun ya da kısa, düz ya da dallanmış zincirli alifatik grup, aromatik, heterosiklik ya da pirolidon halka olabilir. $-\text{NH}_2$ grubu baz ve $-\text{COOH}$ grubu asit özellik gösterdiğinden, amino asitler de hem asit hem bazlarla reaksiyona giren amfoter özelliktedir.

Amino asitler, α karbonlarındaki amino ($-\text{NH}_2$) ve karboksil ($-\text{COOH}$) grupları ile reaksiyona girerek peptit bağlarını oluştururlar. Peptit oluşumunda bir amino asidin karboksil grubundan $-\text{OH}$, diğer amino asidin amino grubundan $-\text{H}$ ayrılır (H_2O şeklinde). Peptit bağı kovalent bağıdır, oluşan zincire peptit zinciri ve oluşan bu amino asit bileşiklere de peptitler denir.

Proteinlerin yapısında bulunan 20 amino asit belirlenmiştir. Uluslararası Teorik ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin ("International Union of Pure and Applied Chemistry", IUPAC) Ortak Biyokimyasal Terminoloji Komisyonu ("Joint Commission of Biochemical Nomenclature", JCBN) ve Uluslararası Biyokimya Birliği ("International Union of Biochemistry", IUB) tarafından amino asitler ve peptitler için standart semboller ve isimlendirmeler belirlenmiştir (Ustunol, 2015). Tablo 2.1.1.1'de amino asitlerin isimleri ve sembolleri verilmiştir. Peptitlerin yapısını ortaya çıkarmak için yapılan analizler rapor edilirken bu kısaltmalar kullanılmaktadır.

Tablo 2.1.1.1: Amino asitler için isimlendirmeler ve standart semboller

Amino asit	Kısaltma	Moleküler ağırlık (Da)	pI
Alanin	Ala, A	89,1	6,00
Arjinin	Arg, R	174,2	10,76
Asparajin	Asn, N	133,1	5,41
Aspartik asit	Asp, D	132,1	2,77
Sistein	Cys, C	121,1	5,02
Glutamik asit	Glu, E	146,1	3,24
Glutamin	Gln, Q	147,1	5,65
Glisin	Gly, G	75,1	5,97
Histidin	His, H	155,2	7,59
İzolösin	Ile, I	131,2	6,02
Lösin	Leu, L	131,3	5,98
Lizin	Lys, K	146,2	9,82
Metiyonin	Met, M	149,2	5,74
Fenilalanin	Phe, F	165,2	5,48
Prolin	Pro, P	115,1	6,30
Serin	Ser, S	105,1	5,68
Treonin	Thr, T	119,1	5,64
Triptofan	Trp, W	204,2	5,89
Tirozin	Tyr, Y	181,2	5,66
Valin	Val, V	117,1	5,96

Amino asitlerin sınıflandırılması genellikle –R gruplarının özelliklerine göre, polaritelerine göre ve esansiyel oluşlarına göre farklı şekillerde yapılmaktadır.

Amino asitler, amin grubu ile birlikte karboksil grubu taşıdıkları için çözeltilerinde, ortamın pH değerine göre aynı zamanda hem asit, hem de baz reaksiyonu gösterebilirler. Bu özelliği taşıyan maddelere amfoter maddeler denir. Amino asitler sulu çözeltilerinde elektriksel yüklü moleküller hâline gelirler. Bu durum karboksil grubun bir proton (H^+ iyonu) verebilmesi, amino grubun ise bir proton alabilmesi sayesinde gerçekleşmektedir. Proton verilmesi amino asidin anyonlaşmasına ve bazik özellik göstermesine, proton alması ise kationlaşmasına ve asidik özellik göstermesine neden olmaktadır. Amfoter durumda ise, amino asitteki karboksil grubu

protein kaybederken, amino grubu protein kazanmaktadır. Bu durumda amino asit aynı anda hem negatif (anyon) hem de (pozitif) yüklüdür. Amino asidin amfoter özellik gösterdiği pH değerine izoelektrik nokta (pI) denir ve her amino asit için spesifik bir değerdir. pI değeri nötral amino asitler için yaklaşık 4,8 – 6,3 arasında, asidik amino asitler için 2,7 – 3,2 arasında, bazik amino asitler için ise yaklaşık 7,6 – 10,8 değerleri arasında değişmektedir. Amino asitler, izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında bazik anyon, düşük pH ortamında ise asit katyon özelliği göstermektedir.

Amino asitler maksimum UV (ultra violet) absorpsiyonunu ve floresans özelliğini farklı dalga boylarında gösterir. Proteinlerdeki yapısal değişimler, bu amino asitler üzerinden gözlenen absorbans ve floresans değişimleri takip edilerek belirlenebilmektedir. Proteinlerdeki konformasyonel değişimler, bu amino asitler üzerinden gözlemlenen absorbans ve floresans değişimleri takip edilerek belirlenebilmektedir.

2.1.2. Alternatif protein kaynağı olarak yağlı tohum posaları

Dünya nüfusunun sürekli büyümesi ve bu durumun özellikle son on yılda katlanarak hızlanması; protein arzı için ciddi bir küresel zorluk oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”, FAO) proteinin yakın gelecekte sınırlayıcı makro besin maddesi olacağını, yeterli miktarda ve uygun kalitede protein almanın her vatandaşın temel hakkı olması gerektiğini belirtmiştir (Campbell, Rempel ve Wanasundara, 2016). Birleşmiş Milletler (BM), hem hayvansal hem de bitkisel kaynaklardan protein alımının dengelenmesini önermektedir (WHO, 2015). Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde hayvansal protein tüketimi artmaya devam etmektedir (Chardigny ve Walrand, 2016). Hayvancılıkta, üretim maliyetleri ile ilgili en belirleyici kriter, protein özelliklerine bağlı olarak hayvan yemi birim ağırlığı başına protein fiyatıdır (FAO, 2004). Hayvansal gıdaların üretimi, bitkisel gıdalardan daha yüksek oranda sera gazı emisyonları ile ilişkilidir. Scarborough vd. (2014), et yiyen bir kişinin sera gazı emisyonunun vegan birine göre iki kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, deli dana hastalığı, dioksin kontaminasyonu ve hayvanlarda hormonların kullanımı gibi gıda güvenliği sorunları, tüketicilerin hayvansal ürünlere olan güvenini zayıflatmıştır (González-Pérez ve Vereijken, 2007). Bununla birlikte, insan vücudu protein sentezi için tüm amino asitlerin dengeli bir alımını gerektirir (Chardigny ve Walrand, 2016)

ve bitkisel proteinler genellikle sülfür içeren amino asitler, özellikle Met, Lys, Trp ve Thr bakımından eksiktir. Bitkisel proteinler, antibesin ögeleri (diğer besin maddelerinin emilimini azaltan bileşikler) içerirler. Tüketici tercihlerine göre, bitkisel proteinlerden yapılan birçok ürün, lezzet, renk ve doku bakımından hayvansal proteinlerle yapılanlardan daha az çekicidir (Liu, 2007).

Gıda fabrikalarında, proses sonucunda yan ürün olarak adlandırılan büyük miktarlarda gıda atıkları oluşmakta ve bunların birçoğu anında imha edilmektedir. Bu durum büyük oranda çevre kirliliğine yol açmaktadır: Alternatif daha düşük teknolojiler kullanılarak bu bileşenler ekonomik değeri az olan ürünler (hayvan yemi, gübre vb.) üretmek için kullanılmaktadır. Gıda işleme sırasında ortaya çıkan atıkların etkili bir şekilde değerlendirilmesi hem çevre kirliliğinin önlenmesi açısından hem de katma değer, istihdam yaratılması ve ürünlerin çeşitlendirilmesi gibi açılardan önemlidir. İlerleyen zamanlarda artan nüfus ile birlikte gıda işleyen fabrikaların sayısının da artacağı kabulünden hareketle, gıda atık miktarlarının ve buna bağlı olarak atık problemlerinin de artacağı ifade edilebilir.

Yağlı tohumların posası, yağ üretim proseslerinde yağ eldesinden sonra kalan önemli bir yan üründür. Yağlı tohumlardan yağ eldesinde pres (basınç) yöntemi ve organik bir çözücü yardımıyla ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Yağlı tohumun yağ oranı %30'un üzerinde ise pres yöntemi kullanılır ama son zamanlarda her iki yöntemin arka arkaya kullanıldığı presasyon-ekstraksiyon yöntemi de tercih edilmektedir (Başoğlu, 2014). Yağlı tohumlar en büyük bitkisel yağ kaynağını sağlar ve ekstraksiyondan sonra kalan kısım protein bakımından zengindir (Lomascolo vd., 2012). 2018/2019'da dünya yağlı tohum üretimi 600,47 milyon metrik ton ile büyük miktarlarda yağlı tohum posasının ortaya çıkmasını sağlamıştır (USDA, 2018). Bu nedenle yağlı tohum posaları, proteinli gıdaların artan talebini karşılamak için iyi bir alternatif protein kaynağıdır. Dünyadaki hayvansal protein talebinin 2050 yılına kadar iki katına çıkması beklenirken (Pojić, Mišan ve Tiwari, 2018), 2010 yılından bu yana bitkisel protein kaynaklarında hızlı bir büyüme olmuştur.

Yağlı tohumlardan protein ekstraksiyonu için belirlenen prosedürler, alkolle yıkama, asitle yıkama veya ısı denatürasyon ile yapılan işlem sonucu klasik alkali ekstraksiyonunu içerir (Kachrimanidou vd., 2015). Proteinlerin ekstraksiyonu için geliştirilen diğer birçok yöntemle karşılaştırıldığında, standart ekstraksiyon veya

direkt alkali ekstraksiyonu en etkili ve en yaygın kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir (Gerzhova vd., 2016). Yağlı tohum posalarından proteinlerle zenginleştirilmiş fraksiyonlar elde etmek için en yaygın olarak kullanılan metodoloji, Louis ve Morton (1957) tarafından patentlenen yöntemdir. Bu yöntem sırasıyla, proteinlerin alkali olarak çözündürülmesini, çözünmeyen materyalin santrifüjleme yoluyla uzaklaştırılmasını, proteinin izoelektrik çökmesini, ardından tekrar santrifüjleme ile ayrılmasını içerir (Chéreau vd., 2016).

Bitkisel izolatları bitkisel kaynaklardan hazırlamak için en yaygın kullanılan prosedürler miselleştirme tekniği (tuz ekstraksiyonu) ve alkali ekstraksiyonu/izoelektrik çöktürme yöntemidir. Alkali ekstraksiyonu/izoelektrik çöktürme tekniği, proteinlerin alkali kullanılarak çözündürülmesini, santrifüjleme ile çözünmeyen materyalin uzaklaştırılmasını, izoelektrik noktaya karşılık gelen pH değerinde protein çökmesini ve santrifüj ile çöktürülmüş proteini toplamayı içerir. Tuz çözeltisi ile protein ekstraksiyonu olan miselizasyon, çözünmeyen materyali uzaklaştırmak için santrifüjleme, ultrafiltrasyon, diyafiltrasyon membranı veya soğuk suda seyreltme ile tuz ekstraktından çöktürme, ardından santrifüjleme ile protein geri kazanımını içerir (Arntfield, Ismond ve Murray, 1985; Paredes-López ve Ordorica-Falomir, 1986). Her iki teknik de farklı ekstraksiyon ve konsantrasyon koşulları kullanılarak uygulanabilir.

Protein ekstraksiyonunun verimini arttırmak için farklı NaCl konsantrasyonu ve pH değerlerinde çalışmalar yapılmıştır. Moure, Sineiro ve Domínguez (2001) 0,5 M NaCl çözeltisi ve pH 11 koşullarını kullanarak *Rosa rubiginosa* tohumlarından proteinlerin %55 ile %60'ını ekstrakte etmiştir. Börülce (%10 (w/v) katı/çözelti oranı) içeren 0,15 M NaCl çözeltisine, pH 9,9 değerinde 2 saat boyunca 35°C'de işlem uygulanmasıyla elde edilen protein verimleri %87'den fazla olduğu tespit edilmiştir (Mune, Minka ve Mbome, 2008).

Protein izolasyonu için alkali ekstraksiyonu/izoelektrik çöktürme tekniği kullanan çalışmalar çoğunlukla pH değerleri 10,0 ve üzerindeki ekstraksiyon koşullarının, ekstrakte edilen proteinlerin veriminin artmasına neden olduğunu ortaya koymuştur (Gerzhova vd., 2016). Mwasaru vd. (1999) ekstraksiyon pH değerindeki artışın 8,5'ten 12,5'e yükselmesinin güvercin bezelyesi ve börülce proteini verimini sırasıyla %35,1'den %58,1'e ve %36,4'ten %53,5'e arttırdığı sonucuna varmışlardır. Arntfield,

Ismond ve Murray (1990), protein ekstraksiyonu sırasında yüksek alkali koşullarının yüksek oranda protein denatürasyonuna yol açtığını tespit etmiştir. Bu nedenle, daha yüksek protein verimleri ile bunların denatürasyon dereceleri arasında bir ilişki bulunmalıdır. Benzer şekilde, sıcaklıktaki artış ve/veya ekstraksiyon süresi de proteinlerin daha iyi ekstrakte edilebilirliğine katkıda bulunur. Bununla birlikte, sıcaklıktaki artış protein termal denatürasyonuna ve proteinlerin çökmesine neden olabilir. Bu nedenle, genellikle protein ekstraksiyonu için oda sıcaklığı (25°C) veya biraz daha yüksek sıcaklıklar tavsiye edilir. Farklı çalışmalarda, ekstraksiyon koşulları süresi genellikle sürekli karıştırma ile 10 ile 60 dakika arasında ve %5-15 (w/v) katı/çözelti oranında ayarlanır (Rodrigues, Coelho ve Carvalho, 2012).

Miselleştirme tekniği ile ilgili olarak, artan iyonik güç genellikle daha yüksek protein geri kazanılabilirliği ile ilişkilidir. Ekstrakte edilen proteinlerin saflığı ile ilgili olarak Mwasaru vd. (1999) miselleştirme tekniği ile elde edilen bezelye tohumunun protein izolatlarının, izoelektrik çöktürme tekniği ile türetilen protein izolatlarına kıyasla daha yüksek saflıkta olduğunu tespit etmişlerdir.

Ultrason destekli ekstraksiyon, Zhu, Sun ve Zhou (2009) tarafından ters misel tekniği yardımıyla yağsız buğday tohumu unundan proteinleri izole etmek için kullanılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında, yağsız buğday tohumu proteinlerinin ekstraksiyon etkinliğinin %37'den %57'ye arttığı görülmüştür. Enzimatik destekli protein ekstraksiyonunun uygulanması, protein ekstraksiyon verimini arttırmak ve ekstraksiyon sırasında protein hasarını azaltmak için farklı enzimlerin (proteaz, selüloz vb.) eklenmesini içerir (Eapen, Kalbag ve Subrahmanyam, 1966).

Ho, Cacace ve Mazza (2007), genellikle fazla miktarda çözücü kullanımı, uzun ekstraksiyon süresi, yoğun iş gücü kullanımı ve fazlaca atık oluşumu nedeniyle solvent ekstraksiyonuna alternatif olarak basınçlı düşük polarite suyuna dayanan ekstraksiyon prosedürünü önermiştir.

Kullanılan ekstraksiyon tekniğine bağlı olarak, protein konsantrasyonu işlemleri, çözünebilir hâldeki proteinlerin izoelektrik değerine yakın pH değerinde basit süzme, diyafiltrasyon membranları veya basit çökeltme aşamalarını içerir. Konsantre protein çözeltisi daha sonra dondurarak kurutma, vakumla kurutma veya spreyle kurutma teknikleri kullanılarak toz hâline getirilir. Protein izolasyonu uygulamasının, yüksek

protein verimi elde etmek, maliyet artışına yol açan aşırı sayıda saflaştırma adımlarından kaçınmak, protein işlevselliğini ve besin değerini korumak, antibesin ögelerini uzaklaştırmak, olumsuz çevre ve sağlık etkilerinden kaçınmak gibi birçok katkısı vardır (Arrutia vd. 2020).

2.2. Biyoaktif peptitler

Herhangi bir ürün için biyoaktivite, bir organizmaya olumlu ya da olumsuz etkiye bulunma durumu olarak nitelendirilebilir (Minkiewicz vd., 2008a). Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları üzerinde faydalı bir etki yapan ve/veya insan sağlığını bilinen besin değerinin ötesinde olumlu etkileyen bir protein içindeki peptit sekansları olarak tanımlanır (Kitts ve Weiler, 2003).

Bu peptitler, gastrointestinal sindirim sırasında enzimatik proteoliz ile serbest bırakılabilir. *In vitro* olarak gıdalardan proteolitik enzimler kullanılarak proteinlerin hidrolizi ile peptitler salınabilir ve ayrıca gıdaların işlenmesi sırasında (pişirme, olgunlaşma ve fermentasyon) hidrolizatlar oluşabilir ve küçük biyoaktif peptit parçaları elde edilebilir (Abdel-Hamid vd., 2017). Bu peptitler, antihipertansif, antimikrobiyal, antitrombotik, immünomodülatör, opioid, antioksidan ve mineral bağlama fonksiyonları gibi sayısız aktiviteleri yoluyla önemli vücut fonksiyonlarını düzenleyebilir (Sánchez ve Vázquez, 2017; Rutherford-Markwick, 2012). Fizyolojik etkilerin görülmesi için proteinler enzimatik olarak peptitlere sindirilmeli, emilmeli ve daha sonra dolaşım yoluyla yeterli konsantrasyonlarda dağıtılmalıdır.

Biyoaktif peptitlerin farklı aktiviteleri, vücuttaki diğer proteinlerle etkileşime gireceği ve doğal süreçleri etkileyeceği için amino asitlerin sekansı tarafından belirlenir (Fields vd., 2009). Biyoaktif peptitlerin yapısı ve fonksiyonelliği arasında tam bir ilişki olmasa da çoğunda bazı özellikler ortak bulunur. Örneğin, bu peptitlerin çoğu 2-20 amino asit içerir ve genellikle hidrofobik amino asitler bakımından zengindir, moleküler kütleleri genellikle 6.000 Da değerinden küçüktür (Sarmadi ve Ismail, 2010; Kitts ve Weiler, 2003; Möller vd., 2008). Bu moleküllerin çoğu düşük dozlarda yüksek biyoaktivite gösterme, spesifik hedeflerle etkileşme ve geniş spektrumlu terapötik etkiler gösterme özelliklerine sahip değerli bileşenlerdir (Marx, 2005). Ancak nispeten büyük peptitlerin biyolojik sistemlerdeki etkilerinin peptit büyüdükçe (örn., 10-51 amino asit) azaldığı anlaşılmaktadır (Roberts vd., 1999). Gıda proteinlerinin biyoaktif peptit

kaynağı olarak rolü son çalışmalarda geniş çapta tanımlanmıştır (Oseguera-Toledo vd., 2014; Lassoued vd., 2015a; Lassoued vd., 2015b). Bu açıdan biyoaktif peptitler, aktivite gösteren spesifik peptit kısmı ana polipeptit zinciri içinde ana proteinin bir parçası olduklarından aktif değildirler, ancak gıdaların işlenmesi veya gastrointestinal sindirimi sırasında enzimlerin etkisi nedeniyle salındıklarında aktif hâle gelirler. Proteaz enzimlerinin kullanılmasıyla, gıda proteinleri parçalanarak biyoaktif peptitler üretilmektedir. Bu enzimlere örnek olarak, pronaz, pepsin, tripsin, kimotripsin, termolisin, Glu-C proteaz, korolaz PP, plazma proteazları ve böbrek membranı proteazları verilebilir (Gibbs vd., 2004; Pihlanto, 2006). Biyoaktif peptitlerin enzimatik yolla hazırlanması; peptit üretiminde toksik kimyasalların ve organik çözücülerin kullanılmaması; son ürünlerin gıda, kozmetik ve ilaç üretiminde kullanılmaya uygun olmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin ilk yatırım maliyetleri ve operasyon maliyetlerinin yaklaşık %70'i kadarına sebep olduğu göz önüne alınmalıdır (Brady vd., 2008).

Farklı açık erişim veri tabanları, biyoaktif peptitlere ait temel kimyasal ve yapısal özellikleri, %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu ("half maximal inhibitory concentration", IC₅₀) değeri, kaynak proteini ve referansları hakkında bilgileri rapor etmektedir (Van Dorpe vd., 2012). BIOPEP veri tabanı tarafından bildirilen sonuçlara göre bugüne kadar üzerinde en çok çalışılan biyolojik fonksiyonlar ACE inhibitör aktivite, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, opioid aktivite, immünomodülasyon ve antitrombotik aktivitelerdir. BIOPEP (2021) veri tabanında yer alan farklı 4169 biyoaktif peptitten ACE inhibitör peptitleri %11,9, DPP-IV inhibitör peptitleri %9,9 ve antioksidatif peptitler %5,9 şeklinde dağılım göstermektedir. BIOPEP, bir veri tabanında biriken biyolojik olarak aktif peptit sekansları hakkında bilgi sağlar. Doğal protein zincirlerinde proteolitik bölünmeye yatkın alanın öngörülmesini, potansiyel olarak biyoaktif protein parçası profillerini ve proteinde biyoaktif parça oluşum sıklığını oluşturma kabiliyetini mümkün kılar (Iwaniak ve Dziuba, 2011).

Literatürdeki birçok çalışma, gıda proteini kaynaklarından türetilen biyoaktiviteleri bildirmiştir. Gıdadan türetilen peptitlerin ilk keşifleri, insanlarda potansiyel sağlığı geliştirici etkileri ile ilgili olarak kapsamlı bir şekilde incelenen süt bazlı ürünlerden

olmuştur (Nongonierma ve FitzGerald, 2016a). Biyoaktif peptitlerin izolasyonu veya üretimi için farklı bitki ve hayvan kaynağı kullanılmıştır.

2.2.1. Biyoaktif peptitlerin üretimi

Çeşitli kaynaklardan biyoaktif peptit üretimine artan bir ticari ilgi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu tür peptitlerin endüstriyel ölçekte üretimi, biyoaktif peptitlerin gıda sistemlerinde aktivitesini koruyan, hatta arttıran uygun teknolojilerin olmaması nedeniyle zorluk oluşturur (Korhonen ve Pihlanto, 2003; Korhonen ve Pihlanto, 2006; Pihlanto, 2006; Kamau vd., 2010). Biyoaktif peptit, sütün fermentasyonu yoluyla süt proteinlerinden üretilir. Özellikle fermente süt, peynir altı suyu ve olgunlaşmış peynirde antihipertansif peptitler tanımlanmıştır. Bu peptitlerin bir kısmı fermente sütler formunda ticarileştirilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Öte yandan, fermente süt ürünlerinde bir miktar biyoaktif peptit tanımlanmıştır ve tansiyonu düşüren süt protein peptitleri ile zenginleştirilmiş birkaç ticari süt ürünü piyasada satılmaktadır.

Enzimatik hidroliz

Proteaz enzimleri protein hidrolizinde yaygın olarak kullanılır ve genellikle protein yapısı içindeki spesifik peptit bağlarını hedeflemektedirler. Örneğin, pepsin amino asitleri Leu veya Phe olduğu bağlardan ayırır. Papain Phe, Lys ve Arg yanındaki zinciri keser. Pankreatin Try, Arg, Phe, Leu, Trp ve Lys bağlarında aktivite gösterir. Bu enzimlerin tamamı gıda işleme endüstrisindeki ürünleri olumlu etkiler (Clemente, 2000). Zhang, Wang ve Xu (2008), hidroliz derecesi ve enzim tipinin soya fasulyesi protein izolatından peptidin demir bağlama kapasitesini etkilediğini bildirmiştir. Ayrıca enzimatik hidroliz sırasında proteinin nispi molekül ağırlığı azalır ve peptitler di-, tri- ve kısa zincirli polipeptitler şeklinde salınır. Bu peptitler, duyuşal özelliğı etkileyen emülsiyon stabilitesi ve hidrodinamik özellik gibi fonksiyonel özellikleri geliştirir. De Oliveira vd. (2015) *Chryseobacterium* sp. kontrollü koşullar altında soya proteini hidrolizatının antioksidan ve fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanmıştır. Soya proteini hidrolizatının demir şelatlama, emülsifiye etme ve köpürme kapasitesini arttırmıştır. Ayrıca, yağsız susam tohumu posalarının papain, pepsin ve alkalaz ile hidrolizi, hidroliz derecesindeki artışın, antihipertansif özellik, antioksidan aktivite, gelişmiş sindirilebilirlik ve diğere fonksiyonel özellikleri içeren

peptitlerin çeşitli fonksiyonel özelliklerini orantılı olarak iyileştirdiğini göstermiştir (Chatterjee vd., 2015).

Kimyasal sentez

Kimyasal organik sentez, belirli fizikokimyasal özellikleri gösteren organik moleküller elde etmek için etkili bir yöntemdir. *In silico* protokollerinin kullanılmasına (Kishore, 2004; Dziuba ve Dziuba, 2010; Udenigwe, Gong ve Wu, 2013) ve sulu çözelti veya katı faz olarak tasarlanmış deneysel yaklaşımların kullanılmasına (Saladino, 2012), biyolojik çalışmalar için kullanılabilircek çeşitli moleküler karmaşıklıklara sahip moleküllerin tasarımına ve üretimine izin verir (Smacchi ve Gobetti, 2000; Freidinger, 2003; Rajesh ve Iqbal, 2006). Birçok biyoaktif peptit tarafından sergilenen terapötik roller, oksidasyon ile ilgili belirli patolojik durumları tedavi etmek için kimyasal sentez yoluyla bunları elde etme amacını ortaya çıkarmıştır (Ialenti vd., 2001; Van Lancker, Adams ve De Kimpe, 2011). Kimyasal olarak sentezlenmiş bir peptidin (Lys-Arg-Glu-Ser) oral yoldan verilmesi, farelerde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) peroksidasyonunu, enflamasyonu ve ateroskleroza azaltmıştır (Navab vd., 2004). Peptit sekansının sırasını Lys-Glu-Arg-Ser olarak değiştirmek, tüm biyolojik aktivitenin kaybıyla sonuçlanmış ve belirli bir yapı-aktivite ilişkisi olduğunu göstermiştir.

Mikrobiyal fermantasyon

Fermente süt ürünlerinin imalatında kullanılan endüstriyel mikroorganizmaların çoğu yüksek oranda proteolitikdir ve bu nedenle fermantasyonları sırasında biyoaktif peptitler üretebilirler (Castellano vd., 2013; Je vd., 2005). Bu bağlamda, fermente sütte tripeptit dizileri Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro, en iyi bilinen ACE inhibitörleri olarak tanımlanmıştır (Nakamura vd., 1995; Sipola vd., 2002). Gıda proteinlerinin proteolitik mikroorganizmalar ile fermantasyonu, endüstriyel ölçekte protein hidrolizatlarının üretimi için ayrı bir işlemdir. Günümüzde, birçok çalışma mikrobiyal fermantasyon kullanılarak biyolojik olarak aktif protein hidrolizatlarının üretilmesine odaklanmıştır (Bueno-Solano vd., 2009; Duarte vd., 2006; Fakhfakh vd., 2013; Jemil vd., 2014). Balakrishnan vd. (2011) daha önce yaptığı çalışmalarda, laktik asit bakterileriyle et parçalarını (işlenmek üzere gelen derilerin üzerinde bulunan) kullanarak elde edilen fermente hidrolizatın yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere sahip

olduğunu göstermiştir. Birkaç balık proteininin bir proteolitik bakteri *Bacillus subtilis* A26 ile fermentasyonu yoluyla protein hidrolizatlarının üretimini rapor etmişlerdir (Jemil vd., 2014). Tüm fermente protein hidrolizatlarının, farklı *in vitro* deneylerle değerlendirilen doza bağlı antioksidan aktiviteler sergilediği ve antibakteriyel aktiviteler sergilediği bulunmuştur. Fermentasyonun avantajı, enzimatik hidrolizin mikroorganizmanın proteazları tarafından gerçekleştirilmesidir ve bu nedenle biyoaktif peptitler, başka hidroliz olmadan saflaştırılabilir. Bununla birlikte, fermentasyon işleminin dezavantajı üretilen peptitlerin düşük verimidir. Ayrıca, fermentasyon sırasında, proteolitik mikroorganizmadan türetilen enzimlerin etkisi ile gıda proteinlerinden salınan bazı biyoaktif peptitler ve amino asitler, suş tarafından büyümesi için karbon ve/veya azot substratı olarak kullanılmaktadır.

2.2.2. Biyoaktif peptitlerin konsantrasyonu ve saflaştırılması

Enzimatik muamelelerden sonra hidrolizatlar tipik olarak çözünmeyen maddeleri ortadan kaldırmak için santrifüj ile ayrılır. İstenen peptit özelliklerine göre peptit molekülleri boyutlarına, yüzey yüklerine ve diğer özelliklerine göre fraksiyonlara ayrılabilir. Biyoaktif peptit elde etmek için protein hidrolizatlarının ayrılması ve saflaştırılması; amino asit kompozisyonu, net yük, hidrofobiklik ve hidrofiliklik derecesi, moleküler ağırlık ve yapısal özellikler gibi birbiriyle ilişkili bir dizi karmaşık faktöre dayanmaktadır (Aluko, 2018; Kitts ve Weiler, 2003). Örneğin, peptitlerin biyoaktif özellikleri en kısa zincir uzunluğundan (7-25 amino asit, MA 800-3.000 Da) etkilenir, en az aktif peptitler genellikle daha uzun bir zincir uzunluğuna sahiptir (Capriotti vd., 2015).

Sekans belirleme ve hazırlanan peptit ya da hidrolizatın özelliklerini inceleyen biyoaktivite testleri, biyoaktif özellikleri bulunan moleküllerin ayrılması için önem arz etmektedir. Ayırma işleminden önce, bir protein hidrolizat karışımı genellikle kaynak materyaldeki proteinleri, enzimleri ve diğer bileşenleri uzaklaştırmak için çöktürme, tuzlama ve çözücü ekstraksiyonuna tabi tutulur (Shahidi ve Zhong, 2008). Ayrıca, tek bir dizinin ayrılması, özellikle de nispeten büyük miktarlarda hedef peptidin gerekli olması hâlinde, zor bir iştir (Hettiarachchy vd., 2012).

Peptit saflaştırması için kılcal elektroforez, kılcal izoelektrik odaklama, ters akım kromatografisi ve santrifüjlü ayırma kromatografisi gibi diğerk saflaştırma teknikleri de kullanılmıştır (Shahidi ve Zhong, 2008; Kařička, 2006; Boudesocque vd., 2012).

Membran fraksiyonlama teknolojileri

Membran fraksiyonlamada, proteinlerin hidrolizi ve santrifüjlemeden sonra elde edilen süpernatant, moleküler ağırlıklarına göre peptitleri fraksiyonlara ayırmak ve konsantre etmek için genellikle yarı geçirgen bir membrana tabi tutulur. Bu, dūřuk moleküler ağırlıklı analitlerin, dūřuk moleküler ağırlık kesme membranına nüfuz etmesine izin verir. Membran fraksiyonlama teknolojileri ucuzdur ve kullanımı kolaydır (Capriotti vd., 2015). Membran fraksiyonlama teknolojilerinin örnekleri arasında nanofiltrasyon ve ultrafiltrasyon bulunur; ultrafiltrasyon peptit fraksiyonlama için bugüne kadar en çok kullanılan yöntemdir. Bezelye proteini hidrolizatları (Li vd., 2011), yumurta ovamisin hidrolizatları (Sun vd., 2016), keten tohumu protein hidrolizatları (Nwachukwu ve Aluko, 2018) ve tavuk tüyü keratin hidrolizatları (Yeo vd., 2018) gibi çok sayıda çalışma, protein hidrolizatından peptitlerin ayrılması için ultrafiltrasyonun önemini göstermiştir. Standart ultrafiltrasyonun kullanımındaki temel zorluk, yarı geçirgen zar ile hidrofobik peptitler arasındaki olası etkileşimlerdir (Muro Urista vd., 2011). Ayrıca, bir ultrafiltrasyon ayırma tekniğinin verimliliğeri, membranlarda farklı gözenek boyutlarının normal dağılımından etkilenir, bu da büyük moleküllerin, özellikle yüksek numune konsantrasyonları ile filtrelenmesine neden olur (Georgiou, Rice ve Baker, 2001). Capriotti vd. (2015), ultrafiltrasyon membranlarının kullanımının büyük miktarda numune gerektirdiğini, bazı esansiyel peptitlerin tükendiğini ve sarkoplazmik ve miyofibriler balık proteinlerinde bulunan hem küçük hem de büyük peptitlerin tutulmasından dolayı ekstra bir iyileştirme adımı gerektirdiğini gözlemlemiştir. Bir elektrodializ adımının dâhil edilmesiyle ultrafiltrasyon teknolojisinin geliştirilmiş bir versiyonu önerilmiştir. Filtrasyon membranı ile elektrodializ olarak bilinen bu teknik, üretilen peptitleri net yüklerine göre benzer moleküler ağırlıklarla eř zamanlı olarak hidrolize etme ve ayırma kapasitesine sahiptir. Örneğinin, Doyen, Husson ve Bazinet (2013) bu tekniğeri süt proteinlerini enzimatik olarak hidrolize etmek ve ardından izole etmek için tek bir işlemdede kullanmıştır. Membran süreçleri biyoaktif peptitlerin büyük ölçekli ayrılmasında yaygın olarak kullanılan işlemlerdir (Korhonen ve Pihlanto, 2006).

Bu işlemler, yarı geçirgen bir membran yoluyla sıvı bileşenlerin geçirgenliğindeki farklılıklara dayanmaktadır. Toplu taşımaya uygulanan itici güç kısmi bir basınçtır. Membran ile konsantrasyon işlemleri ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon, ters ozmoz ve nanofiltrasyon olarak sınıflandırılabilir (Rosenberg, 1995).

Çoğu peptit belirli bir pH değerinde yüklü fonksiyonel gruplar içerir, dolayısıyla nanofiltrasyon membranları, boyut ayırımına ek olarak membranlarla yük etkileşimi temelinde peptitleri ayırmak için kullanılır. Membran süreçlerinin kombinasyonu (ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon) sıklıkla peptitlerin ayrılmasında kullanılır (Beaulieu vd., 2013; Ranamukhaarachchi, Meissner ve Moresoli, 2013; Saidi vd., 2014).

Jel filtrasyon kromatografisi

Mevcut çeşitli kromatografik teknikler arasında jel filtrasyon kromatografisi olan boyutsal ayırım kromatografisi, molekülleri boyut farklılıklarına göre ayırarak en kolay ve en ekonomik yaklaşımı sunmaktadır (Wang vd., 2017). Katı faz matrisinin gözenekleri daha küçük moleküllerin girişine izin verir, bu da ortam boyunca ilerlemesinin daha uzun sürmesine neden olur. Tersine, daha büyük moleküller gözeneklerin dışında tutulur ve daha kısa tutulma süresine sahiptir (Nagy ve Vékey, 2008). Genel olarak, SEC ve/veya membran fraksiyonlanması, sonraki karakterizasyondan önce arzu edilen zincir uzunluklarını veya moleküler ağırlığını elde etmek için protein hidrolizatlarının fraksiyonunun ilk aşaması olarak uygulanır. Ek olarak, hem SEC hem de membran fraksiyonlanması, peptit saflaştırmasında genellikle diğer kromatografik tekniklerle birleştirilip çok aşamalı yöntemler tasarlanır. Bununla birlikte SEC, membran fraksiyonu ile karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek verimli ve ayrışmada daha hızlıdır (Otte vd., 2007).

Tek boyutlu kromatografik bir yaklaşım kullanarak Morais vd. (2015) peynir altı suyu proteinini, bir boyutsal ayırım-yüksek performanslı sıvı kromatografik kolonu (SE-HPLC) kullanarak moleküler ağırlığı 1 kDa'dan az olan dört fraksiyona ayırmıştır. Özellikle, peptit fraksiyonlarındaki farklılıklar, farklı zaman aralıklarında elüte edilen zincir uzunluğuna bağlıdır. Protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması, izokratik koşullar altında bir polar çözücü ile uygun bir kolonda yapılmıştır (Morais vd., 2015). Cotabarren vd. (2019), preslenme sonrası ortaya çıkan çiya tohumu posasından SEC ile zenginleştirilmiş 15 kDa'nın altında moleküler kütleyle sahip protein hidrolizatları

üretmiştir. Antioksidan özellikler sergileyen fraksiyonların, elektroforez ve kütle spektrometrik analizi ile 3 kDa'nın altında bir moleküler kütleye sahip olduğu doğrulanmıştır. Molekül ağırlığının eş zamanlı olarak belirlenmesi ile bir SE-HPLC sisteminin peptit izolasyonu ve saflaştırılmasındaki performansının gözenek hacmi, mobil fazın yapısı, iyonik kuvvet ve SEC katı faz matrisinin tipi gibi parametrelerden etkilendiğine dikkat edilmelidir (Bouvier ve Koza, 2014; Goyon vd., 2017).

İyon değişim kromatografisi (“Ion exchange chromatography”, IEX)

İyon değişim kromatografisi, peptitlerin protein hidrolizatlarından izolasyonu ve ayrılması için yaygın olarak kullanılan başka bir yöntemdir. IEX, biyoaktif peptitleri bir numunedeki yüklü moleküllerin zıt yükü taşıyan katı bir destekle etkileşime girme kabiliyeti ile ayırır. Peptitlerin elüsyonu genellikle elüsyon tamponunun tuz konsantrasyonunu arttırarak veya pH değerini değiştirerek gerçekleştirilir. Bu yöntem, yüksek katyonik veya anyonik peptitlerin fraksiyonlanması için uygundur; bununla birlikte, seçicilikleri düşüktür ve genellikle ayırma için tamamlayıcı bir aşamaya ihtiyaç duyulmaktadır (Wu, Aluko ve Muir, 2009). *Tilapia* balığı peptitleri (Fan vd., 2012) triptik sindirimden sonra IEX (kolon olarak SP Sephadex C-25) kullanılarak ayrılmıştır.

IEX, biyomoleküler ayırma, tarama ve multiomikte yapısal analizde önemli ve kritik bir araçtır (Levison, 2003). IEX'in sabit fazı, ters yüklü molekülleri bağlayan fonksiyonel gruplarla türetilir. IEX türleri için kullanılan fonksiyonel gruplar Tablo 2.2.2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.2.2.1: İyon değiştiricilerde kullanılan fonksiyonel gruplar (GE Healthcare Life Sciences, 2016)

Anyon değiştiriciler		Fonksiyonel grup
Dördüncül amonyum (Q)	güçlü	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Dietilaminoetil (DEAE)	zayıf	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Dietilaminopropil (ANX)	zayıf	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Katyon değiştiriciler		Fonksiyonel grup
Sülfopropil (SP)	güçlü	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Metil sülfonat (S)	güçlü	$-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Karboksimetil (CM)	zayıf	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

Bağlı moleküller daha sonra yer değiştirir ve benzer yüklü molekülün izokratik veya gradyan akışı ile elüte edilir (Parente ve Wetlaufer, 1986; Rocklin, Pohl ve Schibler, 1987). Değişen yüklere (pozitif ve negatif) sahip çok sayıda fonksiyonel grup içeren peptitler söz konusu olduğunda, ilgili peptitler, tamponun pH veya iletkenliğinin bir fonksiyonu olarak izole edilir (Velickovic, Ognjenovic ve Mihajlovic, 2012; Wang vd., 2017). Proteinlerin net yüzey yükü, yüzeyi çevreleyen pH değerine göre değişmektedir. Tipik olarak, izoelektrik noktasının (pI) üstünde olduğunda, bir protein pozitif yüklü bir anyon değiştiriciye bağlanır; pI'nin altında ise bir protein negatif yüklü bir katyon değiştiriciye bağlanmaktadır. Bununla birlikte, protein net bir negatif yüke sahip olsa bile, negatif yüklü bir katyon değiştiriciye bağlanabileceğine dikkat edilmelidir, çünkü protein yüzeyinde bağlanmak için yeterli olabilecek pozitif yüklü kümeler olabilir. Bu, pozitif yüklü bir anyon değiştiriciye net pozitif yüklü bir protein bağlanması ile tersi durum için de doğru olabilir. Bu durumun önüne geçmek için, anyon değiştiricilerde etkin pH arttırabilir ve katyon değiştiricilerde azaltabilir (GE Healthcare Life Sciences, 2010). Bouhallab, Henry ve Boschetti (1996), kappa-kazeinin hidrolizinden elde edilen antitrombotik peptitlerin (Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys, Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys, Lys-Asn-Gln-Asp-Lys, Asn-Gln-Asp-Lys) izolasyonu için güçlü bir katyonik değişim kolonu, HyperD kullanmıştır. IEX, peptitlerin karmaşık besleme akımından izole edilmesi için genellikle ara basamak veya çok aşamalı fraksiyonlamada ana işlem olarak dâhil edilir.

İmmobilize metal afinite kromatografisi (“Immobilized metal affinity chromatography”, IMAC)

İmmobilize metal afinite kromatografisi, metal şelatlayıcı peptitlerinin zenginleştirilmesi/saflaştırılması için uygun bir afinite kromatografi tekniğidir. Protein hidrolizatlarındaki metal bağlayıcı peptitler, bağlayıcılara şelatlı spesifik metal iyonlarına (iminodiasetik asit ve nitrilotriasetik asit gibi) kendiliğinden oluşan afinite yoluyla saflaştırılabilir ve çözünmez bir matris üzerine immobilize edilebilir (Guo vd., 2015; Xie vd., 2015).

IMAC desteklerine bağlanma kapasitesine sahip peptitler içindeki amino asit kalıntıları arasında His, Ser, Trp, Cys, Asp ve Glu bulunur (Puchalska, García ve Marina, 2017). Bu amino asit kalıntıları, nötr pH değerlerinde hareketsizleştirilmiş şelatlı metal iyonları ile tersinir kompleksler oluşturur. Biyoaktif peptitlerin elüsyonu,

pH değerini düşürerek ve mobil fazın iyonik kuvvetini arttırarak yapılabilir. Megías vd. (2008), zenginleştirilmiş His ve Arg amino asit kalıntılarına sahip antioksidatif peptitler elde etmek için ayçiçeği proteini hidrolizatlarının saflaştırılması için Cu^{2+} afinite kolonlarını kullanmıştır. Bu, His ve Arg amino asit kalıntılarının bakırla kompleks oluşturma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. IMAC, hedef biyoaktivite spesifik bir afinite etkileşimi içerdiğinde yararlıdır.

Ters fazlı sıvı kromatografisi (“Reverse-phase liquid chromatography”, RP-HPLC)

Ters fazlı sıvı kromatografisi, polar bir mobil fazda hidrofobik analitlerle etkileşime giren bir hidrofobik sabit fazın kullanımına dayanır. Teknik, bir boyutlu ve çok boyutlu ayırma tekniklerinde protein hidrolizatlarının fraksiyonlanmasında yaygın olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, RP-HPLC kullanımıyla ilgili asıl zorluğun, mobil ve sabit fazlarla etkileşime girdiklerinde peptitlerde konformasyonel değişikliklerin oluşma olasılığı olduğu belirtilmelidir (Cacciola, Dugo ve Mondello, 2017). Fraksiyonlama işlemi sırasında peptitlerin elüsyonu hidrofobikliklerine ve moleküler ağırlıklarına dayanmaktadır (Galli vd., 2018; Wattanasiritham vd., 2016). Amino asit sekansları nedeniyle düşük moleküler ağırlıklı ve düşük hidrofobikliğe sahip peptitler, kolonda düşük bir tutma süresine sahiptir ve bu nedenle kolondan öncelikle ayrılırlar.

Membran teknolojileri (ultrafiltrasyon, elektrodiyaliz) ve kromatografi (SEC, IEX, RP-HPLC) gibi tek aşamalı ayırma tekniklerinin uygulanması nispeten daha kolaydır ve kapsamlı sermaye yatırımı gerektirmez. Ancak, tek aşamalı ayırma teknikleri yüksek ayırma imkânı sağlamaz. Bu sorun, çözünürlük kuvvetini ve ayırma yeteneklerini arttırmak için iki veya daha fazla ayırma tekniğinin birleştirilmesine dayanan sıralı, çok aşamalı ayırma sistemleriyle aşılabılır. Çok aşamalı ayırma tekniklerindeki zorluk, kurulum maliyetinin özellikle rutin endüstriyel uygulamalar için engelleyici olabilmesi ve çözücünün farklı ayırma tekniklerindeki uyumsuzluğudur. Zorluklara rağmen, tek boyutlu saflaştırma biyoaktif peptitlerin preparatif ölçekli üretiminde hâlâ önemli bir rol oynarken, dikkatle seçilmiş çok boyutlu ayırma sistemleri peptitlerin yüksek verim ve ölçeklenebilir düzeyde saflaştırılması için tasarlanabilir.

2.2.3. Biyoaktif peptitlerin tanımlanması ve karakterizasyonu

Gözlemlenen biyoaktiviteden sorumlu sekansların tanımlanması önemlidir ve bitki kaynaklı biyoaktif bileşenlerin araştırılmasında büyük oranda ihmal edilmektedir veya çoğunlukla sadece en olası bazı sekansları tanımlamak için yapılmaktadır (Piovesana vd., 2018). Edman bozunması ve kütle spektrometresi (“mass spectrometry” MS), peptit sekansını yüksek doğrulukla tespit etmektedir (Lee ve Hur, 2017), ancak bu sekanslar, valide edilmedikleri takdirde peptitler sadece potansiyel olarak biyoaktif kabul edilmektedir.

Edman bozunması ile dizi tanımlama

Peptit tanımlaması için kullanılan ilk yaklaşım, yüksek verimli proteomik teknolojilerinin kullanılmasından önce sıklıkla kullanılan Edman bozunmasıdır. Tipik bir prosedürde, Edman bozunması sekanslamadan önce çok zaman alan ve otomatik enstrümantasyon için 50 adet kadar örnek ile sınırlı bir işlem olan kapsamlı bir saflaştırma gerektirmiştir (Rizzello vd., 2016; Berg, Tymoczko ve Stryer, 2002). Biyoaktivite değerlendirmesi amacıyla, sekansı doğrulamak önemlidir, aksi takdirde bir peptit karışımı testlerle doğrulanmadan sadece sekanslanırsa gerçek olmayan veriler elde edilebilir.

Kütle spektrometresi ile dizi tanımlama

Peptit analizi için kütle spektrometresi (MS) ve proteomik teknolojiler yaygın olarak kullanılmaktadır (Piovesana vd., 2018). Bazı durumlarda, MS/MS veya yüksek çözünürlüklü MS ile birleştirilmiş HPLC kullanılır ve seçilen fraksiyonlardaki (Berg, Tymoczko ve Stryer, 2002) veya bütün hidrolizattaki peptitler için sekanslar sağlanır (Gu ve Wu, 2013).

Veri tabanı araştırması, kompleks örneklerde peptitlerin tanımlanmasında proteomik yaklaşımların değerli bir uygulamasıdır. Özellikle, belirlenen bir protein veri tabanı ve bilinen bir enzimatik bölünme kuralı ile uğraşırken çok başarılı olduğu vurgulanmalıdır (Piovesana vd., 2018). Ancak bu biyoaktif peptit çalışmaları için her zaman geçerli değildir. Çoğu durumda, bu çalışmalarda kullanılan enzimler bölgeye özgü değildir ve bu nedenle tanımlama işlemi sadece sonuçların hesaplanması için daha uzun süreler gerektirmez, aynı zamanda peptit tanımlamaları ile ilişkili olasılık

da daha düşük olabilir. Bu sorunlar, çoğu bitki için olduğu gibi, dizilenmemiş organizmalar için özellikle sınırlayıcıdır. Bu durumda, yaygın bir yaklaşım, veri tabanı aramasının daha yüksek sınıflandırmalara genişletilmesini içerir. Arama alanının bu şekilde genişletilmesi, model olmayan bitkilerle yapılan çoğu bitki proteomik çalışmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Capriotti vd., 2013; Armengaud vd., 2014). Ayrıca uygun bir protein temsili sağlamak ve homoloji ile tanımlamaya izin vermek için biyoaktif peptit araştırmalarına (Mäkinen vd., 2016) uygulanmıştır. Tanımlanan karışımın karmaşıklığının azaltılması, özellikle proteaz spesifik olmadığında, tanımlama sayısını ve kalitesini arttırmak için genellikle iyi bir stratejidir (Agrawal, Joshi ve Gupta, 2017). Bu yaklaşım süpürge darısı bitkisinde biyoaktif peptitlerin karakterizasyonu için kullanılmıştır.

De novo peptit tanımlaması, peptit sekansını geri almak için peptidomik çalışmalarda değerli bir alternatiftir. Bu alandaki son gelişmeler kütle spektrometresi enstrümantasyonunun gelişimini takip eder ve elektron transferi ayrışması, elektron yakalama ayrışması spektrumları gibi daha yeni parçalanma teknikleri için *de novo* peptit sekanslamasına izin verir (Yan, Kusalik ve Wu, 2017). Sekanslanmamış organizmalar ve spesifik olmayan enzimler üzerindeki son uygulamalarda *de novo* peptit tanımlamanın örnekleri arasında *Parkia speciosa* tohumundan (Siow ve Gan, 2013) ve kiraz posalarından (García vd., 2015) biyoaktif peptitlerin tanımlanması yer alır. *De novo* peptit tanımlaması standart veri tabanı araştırması ile birlikte kullanılabilir (Babini vd., 2017). Ancak, çok fazla bilgisayar destekli programlara dayalı altyapılar ve uzun süreli çalışmalar planlamak gerekebilir.

Son zamanlarda, proteinlerin içinde bulunan biyoaktif peptidi tanımlamak için yaygın olarak biyoinformatik araçlardan yararlanılmaktadır (Udenigwe, Gong ve Wu, 2013). Biyoinformatik, farklı moleküler yapıların ve fonksiyonların daha iyi anlaşılması için matematik, bilgisayar bilimi ve istatistik gibi disiplinler arası alanların uygulanmasıyla üretilen kavramsallaştırılmış moleküler bilgi alanıdır. Bilgisayar modelleri ve veri tabanı arama algoritması araçları, moleküllerin doğal yapısını anlayarak biyoaktif protein ürünleri üretimini arttırabilir (Kadam ve Lele, 2018). Peptitler, zamanı, maliyeti en aza indirmek ve fonksiyonel özelliği olan istenen peptidin verimliliğini arttırmak için laboratuvaradaki gerçek sentezinden önce *in silico* tasarlanabilir. BIOPEP, EROPMoscow, PepBank, ExPASyPeptideCutter ve PoPS gibi

biyoinformatik araçları, biyoaktif peptit profilinin oluşturulması için enzimlerin proteolitik spesifikasyonlarını simüle etmek için kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır (Kadam ve Lele, 2018). Tablo 2.2.3.1’de güncel çalışmalarda bitkisel kaynaklı proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitlerin farklı üretim, saflaştırma/ayırma ve karakterizasyon metotlarına bağlı tanımlanan peptit sekansları verilmiştir. Ayrıca, protein dizileri başta UniProtKB (The Universal Protein Resource) olmak üzere farklı veri tabanlarından elde edilebilir. BIOPEP, bir veri tabanında biriken biyolojik olarak aktif peptit sekansları hakkında bilgi sağlar. Doğal protein zincirlerinde proteolitik bölünmeye yatkın alanın öngörülmesini, potansiyel olarak biyoaktif protein fragmanının profillerini ve proteinde biyoaktif fragman oluşum sıklığını oluşturma kabiliyetini mümkün kılar (Iwaniak ve Dziuba, 2011). Tasarlanan modeller, boyut, polarite, yük, amino asit sekansı ve peptidin spesifik aktivitesini veren ikincil yapı gibi fizyolojik özelliklerin QSAR (kantitatif yapı-aktivite ilişkisi) analizi ile üretilebilir (Zhou vd., 2013).

Tablo 2.2.3.1: Bitkisel kaynaklı proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitlerin farklı üretim, saflaştırma/ayırma, karakterizasyon metotları ve tanımlanan biyoaktif peptit özellikleri

Protein Kaynağı	Üretim Yöntemi	Saflaştırma/Ayırma Yöntemi	Karakterizasyon Yöntemi	Biyoaktivite Değerlendirilmesi	Biyoaktivite	Peptit Sekansı	Referans
Kamut® Horasan buğday ekşi mayası	<i>Lactobacillus plantarum</i> 98A ve <i>Lactobacillus rhamnosus</i> C249 ile fermentasyon	SEC	NanoLC–ESI-QTOF-MS + Mascot, Proteome Prospector, PEAKS <i>de novo</i> sekanslaması	<i>In vitro</i> testler	Antioksidan	VLPPQQQY	(Babini vd., 2017)
Pirinç	Alkalaz, flavorzim, protameks, pepsin, papain ve tripsin ile enzimatik hidroliz	3-kDa UF; SEC; RP-HPLC	NanoUPLC–MS/MS	<i>In vitro</i> testler	Antioksidan	RPNYTDA, TSQLLSDQ, TRTGDPFF, NFHPQ	(Yan vd., 2015)
Ceviz	Nötral proteaz	3-kDa UF; SEC (2 fraksiyon); SAX (6 fraksiyon); SEC (3 fraksiyon)	MALDI-TOF-MS + Edman bozunması	<i>In vitro</i> testler	ACE inhibitor	YPERPQIP	(Liu vd., 2013)
Kinoa unu	Gastrointestinal sindirim (pepsin, pankreatin)	5-kDa UF; semipreparative RP-HPLC	RP-HPLC–MS/MS	<i>In vitro</i> testler	DPP-IV inhibitörü; α -amilaz inhibitörü; α -glukosidaz inhibitörü	IQAEGGLT, DKDYPK, GEHGSDGNV	(Vilcacundo, Martínez-Villaluenga ve Hernández-Ledesma, 2017)

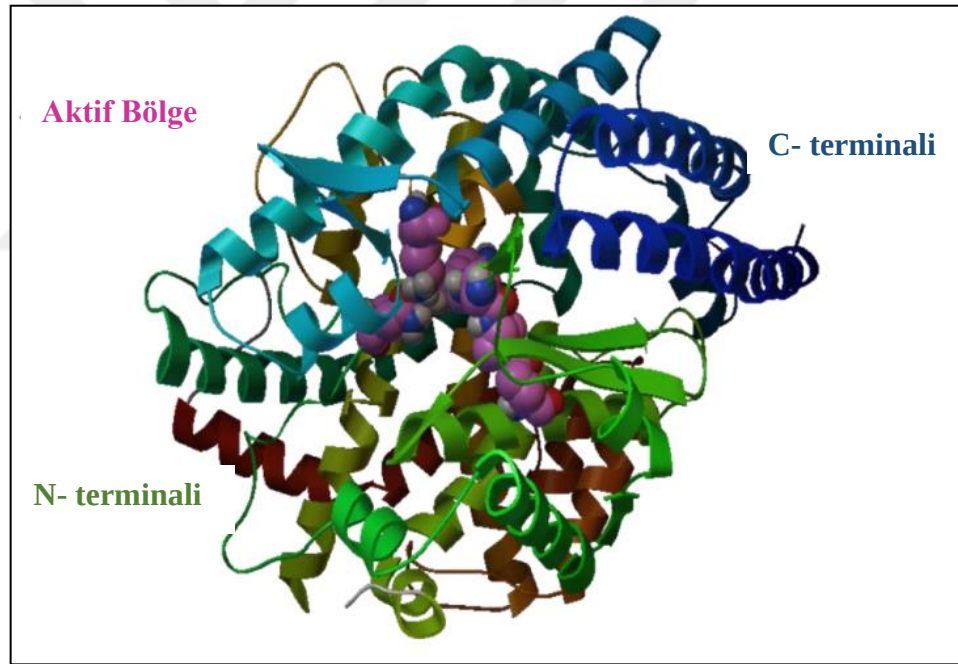
Patates, kolza tohumu	Otoliz (patates); Alkalaz (kolza tohumu)	3-kDa UF (patates); SPE; semipreparative RP-HPLC (50 fraksiyon); RP-HPLC	MALDI-TOF/TOF-MS	<i>In vivo</i> (Goldblatt sıçan modeli)	ACE inhibitor	SLVSPSAAAAAAPGGS, KKRSKKKSFG	(Mäkinen vd., 2016)
Soya tohumları, soya sütü proteinleri, soya sütü (endojen peptitler)	Gastrointestinal sindirim	SPE	NanoHPLC–MS/MS + Mascot	Biyoinformatik (BIOPEP, CAMP)	Antimikrobiyal	LLPHHADADY, YVVFVK, THPLPV	(Capriotti vd., 2015)
Pirinç kepeği	Tripsin	4-kDa UF; SEC (3 fraksiyon); C18 HPLC	QTOF-MS	Fraksiyon üzerinde <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> analizler; <i>in silico</i> etkileşiminde	ACE inhibitor, Antioksidan	YSK	(Wang vd., 2017)
Fıstık posası	Alkalaz	10-kDa UF	NanoHPLC–MS/MS	Biyoinformatik (BIOPEP)	ACE inhibitor	RLKEGDVF, GRGYFGL, OGRGYFGL, OGRGYFGLI	(White, Sanders ve Davis, 2014)
Kolza tohumu	Alkalaz	Zn-afiniti kromatografisi; SEC	RP-HPLC–MS/MS	<i>In vitro</i> testler	Zn şelasyonu	AR, NSM, GKR, EPSH	(Xie vd., 2015)

2.2.4. Biyoaktif peptitlerin biyolojik fonksiyonellikleri

2.2.4.1. Antihipertansif peptitler

Anjiyotensin dönüştürücü enzim, birçok memeli dokusunda meydana gelen spesifik olmayan bir dipeptidil karboksipeptidazdır ve anjiyotensin I'i, kan damarı kasılmalarına neden olabilen güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye dönüştürerek kalp damar sisteminde önemli bir rol oynar (Wijesekara ve Kim, 2010). Bu nedenle, ACE aktivitesinin inhibisyonu, hipertansiyonu kontrol etmek için önemli bir terapötik yaklaşımdır.

ACE'nin analizi, bu enzimin Şekil 2.1 üzerinde gösterildiği gibi iki bağımsız katalitik alandan (N- ve C- terminalleri) oluştuğunu ortaya çıkarmıştır (Soubrier vd., 1988).



Şekil 2.1: Autodock 4.2 ile gösterilen ACE'nin kristal yapısı (PDB kodu: 1O86). (RCSB Protein Data Bank, 2020)

Hipertansiyon ilaçları, özellikle ACE inhibitörleri genellikle renin-anjiyotensin sistemindeki kan basıncını düzenlemek için kullanılır (Boschin vd., 2014). ACE, aktif olmayan prohormon anjiyotensin I'den aktif hipertansif hormon anjiyotensin II'nin üretiminde bir katalizördür ve bir vazodilatör olan bradikininin parçalanmasında rol oynar (Murray ve FitzGerald, 2007; Jang vd., 2011). Aktif hipertansif bradikinin bradikininojenden oluşur ve kinaz II'nin etkisiyle inaktif parçalara dönüşür. Bu

şekilde, sabit kan basıncı hipertansif peptit, anjiyotensin II ve hipotansif peptit bradikinin tarafından korunur (Jang vd., 2011). Renin anjiyotensin sistemi (RAS), RAS yolunu kontrol eden ana regülatörler olarak renin ve ACE ile kan basıncı regülasyonunda hayati bir rol oynar (Daien vd., 2012). Kan basıncı regülasyonu, reninin anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e (AT-I) dönüştürebildiği gerçeğine dayanır, bu da ACE tarafından anjiyotensin II'ye (Ang-II) dönüştürülür. Ang-II, aldosteron salınımını indükleyen ve bu nedenle sodyum konsantrasyonunu ve kan basıncını arttıran güçlü bir vazokonstriktördür. Ayrıca, ACE'nin güçlü bir vazodilatör olan bradikinin (Yang, Erdös ve Levin, 1970) hidrolize ettiği ve böylece kan damarlarının kasılmadan sonra gevşememesine yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle, ACE aktivitesini inhibe ederek, anjiyotensin II oluşumu ve bradikinin yıkımı azalacaktır, bu da kan basıncının düşmesine katkıda bulunabilir. Başka bir strateji, renin aktivitesini doğrudan inhibe etmektir, bu da RAS'ın daha eksiksiz bir blokajını sağlayabilir, çünkü renin RAS'ta kritik bir adımı katalize eder (Fitzgerald, 2011). Ek olarak, oksidatif stres, kan basıncında ilişkili artışla kardiyovasküler ve böbrek hasarını indükleyen hipertansiyonun hem nedeni hem de sonucudur. Dolayısıyla, ACE vasıtasıyla kan basıncı regülasyonundan farklı metabolik yollar sorumlu olabilir (Meisel vd., 2006). ACE etki biçimleri şu sistemlerle ilgilidir: renin-anjiyotensin sistemi (RAS), renin-kimaz sistemi, kinin-nitrik oksit sistemi, nötr endopeptidaz sistemi.

ACE önleyiciler dışında biyoaktif gıda peptitleri, renin, anjiyotensin reseptörleri, kalsiyum kanalları ve sempatik sinir sistemi ile etkileşime girerek ACE inhibitörü olabilirler (Udenigwe ve Mohan, 2014). Gıda proteininden türetilen peptitlerin potansiyel antihipertansif yolları vardır (Miralles, Amigo ve Recio, 2018).

Peptitlerin ACE inhibisyonu, rekabetçi veya rekabetçi olmayan enzim inhibisyonu olabilir (Guang ve Phillips, 2009; Maestri, Marmiroli ve Marmiroli, 2016; Toopcham vd., 2017). Rekabetçi enzim inhibisyonu, substrat bağlanmasını önlemek için inhibitörün aktif enzim bölgeleri ile etkileşimi olarak tanımlanır (Shi vd., 2014). Rekabetçi olmayan enzim inhibisyonu, inhibitör molekülünün hem serbest enzim hem de enzim-substrat kompleksi için bağlanma afinitesine sahip olduğu durumu belirtir (Sornwatana vd., 2015). Jang vd. (2011), *Pleurotus cornucopiae* mantarı kaynaklı saflaştırılmış ACE inhibitörlerinin hepsinin rekabetçi olmayan inhibitörler olduğunu bildirmiştir. Ek olarak, Shi vd. (2014) yer fıstığından gelen peptitlerin ACE'nin aktif

bölgesinde substratla rekabetçi bir şekilde bağlandığını ve rekabetçi bir inhibitör paterni gösterdiğini bildirmiştir. ACE üzerindeki peptitlerin (rekabetçi veya rekabetçi olmayan) inhibisyon paternini belirlemek için Lineweaver-Burk grafikleri (Jang vd., 2011; Shi vd., 2014; Lee vd., 2004) ve/veya moleküler yerleştirme (Sornwatana vd., 2015) kullanılabilir. ACE inhibitörü ve enzim arasındaki bağlanma türü, moleküler yerleştirme ile açıklanabilir.

Alkalaz, flavorzim, termolisin, tripsin, kimotripsin, pepsin, papain, nötraz, bakteriyel ve fungal proteazlar gibi proteinleri hidrolize eden birçok farklı proteolitik enzimin rapor edildiği bildirilmektedir (Gu ve Wu, 2013; Thewissen vd., 2011; Chiang vd., 2006; He, Liu ve Ma, 2013). Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Trp ve Met gibi C- terminal kalıntısında zengin hidrofobik amino asit içeriğine sahip peptitler, bölünme önceliğinden dolayı alkalaz ile elde edilebilir (Da Costa, Da Rocha Gontijo ve Netto, 2007). Termolisin söz konusu olduğunda, Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val, Ala veya Met gibi hidrofobik N- terminal kalıntısı olan peptitlerin, ACE aktivitesi potansiyeli için önemli olduğu bilinmektedir (Matsubara, 1966; Arnold vd., 1996). Ek olarak pepsin, tripsin ve alfa-kimotripsin, peptit sindiriminin gastrointestinal simülasyonunda kullanılan diğer önemli enzimlerdir (Iwaniak, Minkiewicz ve Darewicz, 2014; Maestri, Marmiroli ve Marmiroli, 2016; García-Tejedor vd., 2014). Alfa-kimotripsin, peptit bağlarının hacimli yan zincirlerle ve polar olmayan amino asitlerle bölünmesini sağlar (Jung vd., 2005). Val, Ala, Leu, Pro, Tyr, Phe, His ve Trp gibi C- terminal amino asitli peptitler, alfa-kimotriptik hidroliz ile elde edilebilir (Jung vd., 2006). Tripsin, diğer taraftan, peptidi Lys veya Arg'den sonra ayırır (Kim vd., 1999). Ala, Leu, Pro, Tyr, Phe, His ve Trp, alfa-kimotriptik hidroliz ile elde edilebilir (Jung vd., 2006). Bazı çalışmalarda, enzimlerin kombinasyonu enzim özgüllüğüne bağlı olarak potansiyel ACE inhibitör peptitlerin seviyesini arttırmak için kullanılmaktadır (Ambigaipalan, Al-Khalifa ve Shahidi, 2015; Majumder ve Wu, 2010). Ayrıca, iki veya daha fazla enzimin bir kombinasyonu, tek enzimatik işlemten daha yüksek ACE inhibe edici aktivite gösterebilir. Çalışmada, ayrı ayrı enzimlere göre, alkalaz ve termolisin karışımı ile 530 µg/ml IC₅₀ değeri gösteren yüksek bir ACE inhibitör aktivitesi elde edilmiştir (Ambigaipalan, Al-Khalifa ve Shahidi, 2015). Çözünebilir enzimlere bir alternatif olarak, hareketsizleştirilmiş enzimler ACE inhibisyonunda kullanılabilir. Isı veya asitleştirme ile inaktive edilmeleri gerekmez (Mateo vd., 2007), dolayısıyla peptit üretimi ve işlem koşulları açısından çeşitli avantajları vardır (Cao, 2005).

ACE inhibitör peptitlerin enzimatik üretiminde yüksek verim elde etmek için yüksek basınç, ultrason ve mikrodalga gibi yeni teknikler kullanılarak araştırmalar yapılmıştır (Hernández-Ledesma, del Mar Contreras ve Recio, 2011; Qu vd., 2012; Otağ ve Hayta, 2016). Garcia-Mora vd. (2015) yüksek basıncın kısa zincirli (<3 kDa) daha fazla peptit elde ederek mercimek hidrolizatların ACE inhibe edici aktivitesini arttıran farklı enzimlerle proteolizine yardımcı olduğunu göstermiştir. Yüksek basıncın büyük olasılıkla enzimlerin substrata daha yüksek erişilebilirliği ve yeni hedef kalıntılarının maruz kalması nedeniyle biyoaktif sekansların salınmasını teşvik ettiği sonucuna varılmıştır (Garcia-Mora vd., 2015). Yüksek basınç uygulamasına benzer şekilde, ultrason teknikleri de enzimatik sürece yardımcı olarak kullanılmıştır (Qu vd., 2012; Jia vd., 2010). ACE inhibisyonu üzerinde önemli bir rolü olan C- terminal hidrofobik amino asit kalıntısına sahip daha fazla peptit, ultrasonikasyon ile elde edilebilir, çünkü bu ön uygulama, daha fazla hidrofobik grup ve moleküllerin içindeki bölgelerin dışarıya çıkmasını sağlar (Jia vd., 2010). Başka bir çalışmada Otağ ve Hayta (2016), mikrodalgaların nohuttan elde edilmiş peptitlerin enzimatik hidroliz ile ACE inhibitör aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmış ve mikrodalga ile muamele edilmiş numunelerde daha yüksek ACE inhibitör aktivitesi bulmuşlardır (%4,5 artış).

ACE inhibitör peptitler genellikle 2-12 amino asit içeren kısa zincirli peptitlerdir ve kristalografi çalışmaları büyük peptitlerin ACE'nin aktif bölgelerine bağlanamadığını göstermektedir (Natesh vd., 2003). Bazı durumlarda, uzun zincirli peptitler ACE inhibe edici aktiviteye sahip olabilir (Qu vd., 2012). Bazı durumlarda amino asit tipi, peptidin uzunluğundan daha önemli olabilir. Peptitler, net negatif bir yüke neden olabilecek yüksek asidik amino asitler (Asp ve Glu) içerdiğinden bu durum, amino asit bileşimi ile ilişkili olabilir. Negatif yüklü peptitlerin ACE ile etkileşimi, enzim aktivitesi için gerekli olan çinko atomlarının şelatlanması yoluyla katalitik hızda azalmaya neden olabilir (Aluko, 2015). ACE inhibitör peptitler genellikle C- ve/veya N- terminalinde spesifik amino asit kalıntılarında oluşur (Iwaniak, Minkiewicz ve Darewicz, 2014). Peptitlerde Tyr, Phe, Trp, Pro, Lys, Ile, Val, Leu ve Arg varlığının ACE bağlanması üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Murray ve FitzGerald, 2007; Gu ve Wu, 2013; Guang ve Phillips, 2009; López-Fandiño, Otte ve Van Camp, 2006). ACE inhibisyonunun azalması nedeniyle C- terminalinde Arg kalıntısının uzaklaştırılmasına bağlı olarak (Murray ve FitzGerald, 2007; FitzGerald ve Meisel, 2000) C- terminalinde pozitif yüklü amino asitlerin aynı zamanda

peptitlerin inhibitör etkilerini de etkilediği belirtilmiştir (Guang ve Phillips, 2009). Dipeptitlerden oligopeptitlere kadar değişen farklı ACE inhibitör sekansları vardır (Jang vd., 2011). Bu dipeptitler, hacimli ve hidrofobik yan zincirlere sahip amino asitler içerir. Tripeptit söz konusu olduğunda, yapısal özellik birinci kalıntıda aromatik bir amino asit, ikinci kalıntıda pozitif yüklü bir amino asit ve üçüncü kalıntıda hidrofobik bir amino asit olarak rapor edilmiştir (Wu, Aluko ve Nakai, 2006). Daha uzun zincirli peptitler söz konusu olduğunda, inhibisyon etkisi C- terminal amino asitlerle ilişkilendirilmiştir (Iwaniak, Minkiewicz ve Darewicz, 2014).

Bilinen sekanslara sahip çok sayıda ACE inhibitörü, yapısal özelliklerinin ACE inhibisyonundaki rolü ile ilgili çalışmaların amacı hâline gelmiştir. İnhibitör ve ACE arasındaki tam etkileşim mekanizması bilinmemekle birlikte, peptidin (inhibitör) ACE'nin C- alanı ile etkileşime girmesi oldukça olasıdır (Meisel vd., 2006). ACE inhibitör aktivitesi ile peptitleri karakterize eden bazı yapısal özellikler de vardır. Cheung vd. (1980), peptitlerin ACE inhibitör aktivitesinin, N- veya C- terminal amino asit kalıntılarının ACE aktif bölgesi için afinitesine bağlı olduğunu belirtmiştir. Bu bakış açısından, Matsui, Li ve Osajima (1999), 12 ACE inhibitör peptidini sardalya kas hidrolizatından ayırmışlar ve dipeptidin, 5,2 mM IC₅₀ değerine sahip valintirosinin, anahtar bir ACE inhibitörü olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir. ACE inhibitör peptitlerinin çoğunun sadece 2 ile 9 amino asit içeren kısa yapı peptitleri olduğu bildirilmiştir. Di- veya tri- peptitlerin, özellikle C- terminal Pro veya hidroksil Pro kalıntılarına sahip olanların genellikle sindirim enzimleri tarafından bozunmaya dirençli olduğu bilinmektedir (Vermeirssen, Van Camp ve Verstraete, 2004). Ayrıca, iki veya üç amino asitten oluşan kısa peptitler, serbest amino asitlerden daha hızlı emilir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2008). Kendiliğinden hipertansif sıçanlarda bulgular, bir C- terminal Tyr kalıntısı olan dipeptitlerin, C- terminalindeki fenilalaninli dipeptitlere kıyasla sistolik kan basıncında yavaş ve uzun süreli bir azalmaya neden olduğunu gösterdi. Aksine, C- terminal fenilalaninli dipeptitler daha hızlı bir azalma ve daha kısa etki süresi göstermiştir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2008). Mundi ve Aluko (2014) moleküler kütleleri 1 kDa ve 5-10 kDa'dan az olan peptit fraksiyonlarının, 1-3 ve 3-5 kDa peptit fraksiyonları ile karşılaştırıldığında artan hidrofobik (Val, Ile ve Leu) ve aromatik (Phe ve Trp) amino asit seviyelerine göre daha yüksek renin inhibe edici aktiviteye sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Daha küçük boyutlu peptitlerin, daha büyük boyutlu peptitlere kıyasla daha yüksek bağırsak

absorbsiyonu ve hücrelere girme olasılığı daha yüksek olduğu için daha biyoaktif olabileceği bilinmektedir. Udenigwe vd. (2012), renin inhibisyonunun artırılmasında, amino asidin yapısının ve pozisyonunun, peptitlerin boyutundan daha önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. Mundi ve Aluko (2014) ayrıca, barbunya protein hidrolizatının peptit fraksiyonlarının, nötraz ile hazırlanan maş fasulyesi hidrolizatından daha yüksek ACE inhibitör aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Bu bulgulardaki farklılıkların, üretilen peptit tipini etkileyebilecek olan peptidaz tipindeki farklılıklar, kullanılan örneğin konsantrasyonu ve peptidaz-substrat oranı ile ilişkilendirilebileceği sonucuna varmışlardır. Matsui ve Tanaka (2010) antioksidan ve ACE inhibitör aktiviteleri olan peptitlerin, genellikle hedef enzimler veya serbest radikallerle emilimi ve etkileşimi arttıran hidrofobik amino asitler açısından zengin olduğunu bildirmiştir.

Sütten elde edilen biyoaktif peptitler insan sağlığı ve beslenmesinde önemli rol oynar (Sánchez ve Vázquez, 2017). Bu peptitlerin bazıları çeşitli fonksiyonel özelliklere sahiptir, örneğin beta-kazeinin 60-70 sekansındaki peptitler ACE inhibitör aktiviteleri sergiler. Bu sekans, yüksek hidrofobikliği ve Pro kalıntılarının varlığı nedeniyle proteolizden korunur (Sharma vd., 2010). Muguerza vd. (2006), süt proteinlerinin enzimatik hidrolizinden izole edilmiş ACE inhibitör peptitlerini (örn., Val-Arg-Tyr-Leu) tespit etmiştir. Keçi sütü hidrolizatından 316 ile 354 $\mu\text{mol/L}$ arasında değişen IC_{50} değerlerine sahip üç yeni ACE inhibitör peptidi saptanmış ve bu peptitler aynı zamanda kendiliğinden hipertansif sıçanlarda antihipertansif etki göstermiştir (Erdmann, Cheung ve Schröder, 2008). Raikos ve Dassios (2014), insan sütünde güçlü bir ACE inhibitörü ortaya koymuş ve His-Leu-Pro-Leu-Pro sekansı ile beta-kazein f fragmentine (125-129) karşılık gelmiştir. Bu durumda, C- terminal ucunda Pro amino asit varlığının gözlemlenen aktivite açısından çok önemli olabileceği düşünülmüştür (Raikos ve Dassios, 2014).

İnhibisyon kapasitesine ek olarak, yapısal özellikler peptitlerin acılığında önemli bir rol oynar. ACE inhibitör peptitlerin acılıklarının, gıda maddelerine katılması için önemli bir sorun olduğu düşünülmektedir (Hernández-Ledesma, del Mar Contreras ve Recio, 2011). Hacimli grupların ve hidrofobik amino asitlerin yerinin, ACE inhibitör peptitlerin acı tadında önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Pripp ve Ardö, 2007; Wu vd., 2014). Dipeptidil peptidaz-IV, çeşitli hücrelerde, özellikle karaciğer, böbrek ve bağırsak dâhil olmak üzere epitel dokularında hem membran proteini olarak hem de

çözünür formlarda sentezlenen bir serin proteazdır (Lambeir vd., 2003; Lorey vd., 2003; Thoma vd., 2003). Prolil, oligopeptidaz familyasına aittir ve aminopeptidaz aktivitesini N- terminal dipeptidin en sonunda yer alan prolin, hidroksiprolin, dehidroprolin ya da alanin ayrılmasını katalizlemektedir (Thoma vd., 2003). DPP-IV enzimi, peptitlerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin aktivasyonu veya inaktivasyonu ile sonuçlanan proteolitik etki de dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde çok sayıda rol oynamaktadır (Cohen, Fruitier-Arnaudin ve Piot, 2004; Cunningham ve O'Connor, 1997; Lambeir vd., 2003).

2.2.4.2. Antidiyabetik peptitler

Çeşitli organlar (tükürük bezleri, pankreas ve ince bağırsak) ve bunlardan salgılanan enzimler proteinlerin ve karbonhidratların sindirilmesine izin vererek kan şekeri seviyesini etkiler. Başlangıçta, tükürük bezleri ve pankreas tarafından salgılanan α -amilaz, nişasta ve glikojen gibi doğal substratları gıdadaki glikoz ve maltoza dönüştürerek kan şekeri seviyesinde bir artışa neden olur. Benzer şekilde, ince bağırsaktaki α -glukosidaz, nişasta granüllerini parçalar ve kan glikoz seviyesini arttırır.

Farklı bir işlemde, inkretin glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1), bir öğüne yanıt olarak bağırsak enteroendokrin L hücrelerinden salgılanır. Serbest bırakılan GLP-1, mide hareketliliğini kontrol eden gastrointestinal refleksleri aktive edebilir, böylece mide boşalmasını yavaşlatır (Drucker, 2006). Eş zamanlı olarak, GLP-1, glukagon salınımını bastırırken, insülin salınımını uyarmak için endokrin pankreasındaki Langerhans adacıklarında bir hormon görevi görür (Drucker ve Nauck, 2006). GLP-1'in bu ani ve çoklu etkileri, postprandiyal kan şekeri seviyesinin dalgalanmasını azaltır. Bununla birlikte, endojen GLP-1, esasen DPP-IV ile yaklaşık 2 dakikalık bir yarılanma ömrü ile hızla bozunur. İnsülin gibi yaygın diyabet ilaçlarının aksine, GLP-1 tedavisi hasta ağırlığını azaltabilir ve Tip 2 diyabet hastalarını etkileyen önemli faktör olan hipoglisemi riskini azaltabilir. GLP-1'in önemli etkisi göz önüne alındığında, GLP-1 ve DPP-IV inhibitörlerinin reseptör agonistleri, kan şekeri seviyesini düşürmek için araçlar olarak geliştirilmiştir.

DPP-IV, insülin sekresyonunu, GLP-1 ve glikoza bağımlı insülinotropik peptidi arttıran iki inkretin hormonunu etkisiz hâle getirir. Bu nedenle, DPP-IV'ün inhibisyonu

diyabet tedavisinde moleküler bir hedeftir. DPP-IV inhibitör aktivitesi, düşük molekül ağırlıklı peptitler ve ayrıca peptitleri oluşturan amino asitlerin özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Nongonierma vd. (2014) ve Tulipano vd. (2015) güçlü DPP-IV inhibitör peptitlerin genellikle Leu, Ile veya Val gibi dallı zincirli bir amino asit veya N- terminal pozisyonlarında yan zincirde (öncelikle Trp) bir polar grup içeren bir aromatik kalıntı içerdiğini belirtmiştir. Bununla birlikte, DPP-IV inhibe edici peptitler aktif bir araştırma alanıdır. Bir fasulye türü alkalaz tarafından hidrolize uğratıldığında, daha küçük peptitler en yüksek DPP-IV inhibisyonunu göstermiştir (Oseguera-Toledo, de Mejia ve Amaya-Llano, 2015). Fraksiyon (<1 kDa) yaklaşık %55,3 DPP-IV inhibe edici aktivite sergilemiştir.

GLP-1 agonistleri ve DPP-IV inhibitörleri, Tip 2 diyabet için inkretin bazlı tedavilerdir, ancak farklı etkinlik ve yan etki profilleri sergilerler. Tran vd. (2018), Tip 2 diyabetli erişkinlerde glisemik kontrol, kilo kaybı ve yan etkilerin insidansı için GLP-1 agonistlerini ve DPP-IV inhibitörlerini etkilerini açısından karşılaştırmak için sistematik bir inceleme ve meta-analiz gerçekleştirmiştir. DPP-IV inhibitörleri ile karşılaştırıldığında, GLP-1 agonistlerinin HbA1c ve ağırlıkta daha fazla azalma sağladığını, gastrointestinal semptom insidansının arttığını ancak hipoglisemi olmadığını bulmuşlardır. DPP-IV inhibitörü ile karşılaştırıldığında, GLP-1 agonisti daha büyük glisemik kontrol ve kilo kaybı sağlamıştır.

DPP-IV inhibitörleri, insülin seviyesini iyileştirmek, kan şekeri seviyesini düşürmek ve hipoglisemi ve artan vücut ağırlığını sınırlamak için hareket edebilmektedir. Siyah fasulyelerden izole edilen peptitler, diyabetik bir sıçan modelinde glikoz emilimini azaltmış ve eş zamanlı olarak postprandiyal glikozu düşürmüştür (Mojica vd., 2016). Bu DPP-IV inhibitörlerinin etkileri oldukça ümit verici olmakla birlikte, *in vitro* ve *in vivo* verileri doğrulamak ve bu peptitlerin insanlarda etkinliğini, biyoyararlanımını ve güvenliğini doğrulamak için klinik çalışmalar gereklidir.

2.2.4.3. Asetilkolinesteraz inhibitör peptitleri

Alzheimer hastalığı, patolojik olarak plak oluşumu ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır, burada ana bileşen, amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik işlenmesinden türetilen 39-43 amino asit peptidi olan amiloid beta peptididir (Ap) (Martorell vd., 2013; Ertekin-Taner vd., 2005). Çözünmeyen Ap,

beyinde filamentler ve yaşlılık plakları oluşturur (Wisniewski vd., 1998). APP'nin fizyolojik olmayan metabolizması hücrel membran tabakasının hasar görmesi ve APP'nin çöpcü lizozomlarına maruz kalması nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Leszek vd., 1999). Ap oluşumunu bloke eden bileşikler sonuçta Alzheimer hastalığı tedavisinde klinik olarak yararlı olabilir (Wang vd., 2011; Cummings vd., 1996).

Enzimlerin nörodejeneratif bozuklukların gelişimine katılımı iyi bilinmektedir (Rosenblum ve Kozarich, 2003; Meakin vd., 2012). Yaşlılık plakları, nörofibriler düğümler ve geniş nöron kaybı ile birlikte kolinerjik anormallikler, Alzheimer hastalığının temel özellikleridir. Merkezi sinir sisteminde bulunan AChE, ACh'nin koline hidrolizini katalizlemektedir. ACh sinaptik yarıktaki salınır, burada hem sinaptik hem de presinaptik kolinerjik reseptörleri aktive eder, bu da biliş gelişimi ile sonuçlanır. Bir kolinesteraz enzimi olan AChE, bu sinir uyarıcı aktiviteyi sonlandırır (Kihara ve Shimohama, 2004). Alzheimer hastalarında, bu nörotransmitterin bir eksikliği gözlenir. AChE, Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynar. AChE'nin bu peptidin çözünmeyen plaklara birikmesini arttıracak şekilde Ap ile doğrudan etkileşime girdiği düşünülmektedir (Rees ve Brimijoin, 2003).

Alzheimer hastalığı üzerinde kontrol, ACh etkisinin AChE inhibisyonu yoluyla sağlanır. Mevcut ilaçlar, proteaz veya asit aktarımı olmak üzere iki etki mekanizması sergiler. Proteaz inhibitörleri, asetilkolinesterazın anyonik bölgesi için bir afiniteye sahiptir ve asetilkolinin ona erişmesini önler (rekabetçi inhibitörler). Asit transfer inhibitörleri enzim ile reaksiyona girer ve bir ara bileşik oluşturur. Bu ürünün stabilitesine bağlı olarak, etkiler kısa süreli ve geri dönüşümlü veya uzun etkili ve geri dönüşümsüz olabilir (Nair ve Hunter, 2004). İlaçlar ve gıdadan türetilmiş peptitler için hedef, tau proteini hiperfosforilasyonunun ve Ap kaskadının potansiyel oluşumunun önlenmesidir (Hong-Qi, Zhi-Kun ve Sheng-Di, 2012).

In vitro çalışmada, Su vd. (2016) *Coilia mystus* balığının protein hidrolizatının asetilkolinesterazın inhibisyonu yoluyla hafıza eksikliği için terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. AChE, ACh'in kolin ve asetik aside hidrolizini katalizlemekten sorumludur, bu da asetilkolin seviyelerinde azalmaya yol açar. ACh, hafızayı, konsantrasyonu ve bilinci düzenleyen küçük molekül bir nörotransmitterdir. Su vd. (2016) fareler üzerinde *in vivo* bir deneyde bu hipotezi takip

etmiş ve hidrolizatı kullanarak müdahalenin skopolamin bozukluğu olan farelerin uzamsal belleğini iyileştirebileceğini belirtmiştir.

Diyabetli ve yüksek kolesterolü olan hastaların beynindeki kan damarı hasarı Alzheimer hastalığı semptomlarına yol açabilir, diyabet ve yüksek kolesterolün önlenmesi Alzheimer hastalığı gelişme riskini azaltmaya yardımcı olabilir (Zhu vd., 2015). Pankreatik bir peptit olan amilin, kan beyin bariyerinden geçen 37 amino asit uzunluğunda, Tip 2 diyabetin klinik tedavisinde etkili bir ilaç olarak görülmüştür (Zhu vd., 2015). Ayrıca, enjekte edildiğinde, bu peptit Alzheimer hastalığının deneysel hayvan modellerinde davranış bozukluğunu ve beyin amiloid patolojisini azaltmıştır. Kannan, Hettiarachchy ve Mahedevan (2012), kepekli pirinç hidrolizatından, anti-Alzheimer aktivitesini arttıran bir pentapeptit tanımlamıştır. DPP-IV inhibitörleri ve Alzheimer hastalığının önlenmesinde olası rolleri ile ilgili bugüne kadar birkaç *in vivo* çalışma yapılmıştır. Tip 2 diyabet hayvan modelinde DPP-IV inhibitörü sitagliptinin kan retinal bariyerinde koruyucu etkileri gösterilmiştir (Kannan, Hettiarachchy ve Mahedevan, 2012).

Biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan karmaşık oksidatif reaksiyonların çeşitliliğinin, nükleik asitlere, proteinlere ve doymamış yağ asitlerine zarar veren indükleyici yağ türlerine bağlı olarak aşırı reaktif oksijen türlerinin *in vivo* oksidatif strese neden olmasına, dolayısıyla, Alzheimer ve koroner arter hastalıkları için risk oluşturduğu bilinmektedir (Chakrabarti, Jahandideh ve Wu, 2014; Fan vd., 2010).

2.2.4.4. Antioksidatif peptitler

Normal fizyolojik konsantrasyonlarda, reaktif oksijen türleri, gen ekspresyon sistemleri için sinyal molekülleri olarak işlev görmek yanı sıra hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre içi sinyal iletim yollarını modüle etmek de dâhil olmak üzere biyolojik sistemlerde önemli roller oynamaktadırlar (Verbon, Post ve Boonstra, 2012; Wang vd., 2018). Günlük fizyolojik işlemlerin normal seyrinde üretildiğinde, hidroksil radikalleri, tekli oksijen, süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, canlı (aerobik) organizmalar tarafından verimli bir şekilde nötralize edilebilir ve ortadan kaldırılabilir. Bunun nedeni, bu organizmaların son derece gelişmiş endojen antioksidan savunma sistemleri ile yeterince donatılmasıdır (Harnedy, O'Keeffe ve Fitzgerald, 2017; Wu vd., 2017). Bu savunma sistemleri arasında enzimatik (glutatyon

peroksidaz, katalaz) ve enzimatik olmayan (glutasyon, tokoferol, askorbik asit, melatonin) antioksidanlar yer almaktadır (Görlach vd., 2015; Lobo vd., 2010).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin/serbest radikallerin üretimi arasındaki dengesizlikle beraber vücutta üretildikçe bunları çıkarmak için yeterli endojen antioksidan bulunmaması sırasında oluşur. Endojen antioksidan bileşiklerin tükenmesi ve/veya aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimi, membranlar, proteinler, enzimler ve DNA üzerinde zararlı etkilere neden olarak kronik hastalık durumlarının ilerlemesine neden olabilir (Yongvanit, Pinlaor ve Bartsch, 2012). Beyin işlev bozuklukları, diyabet, kalp hipertrofisi ve kardiyovasküler hastalıkların yönetiminde oksidatif stres derecesini azaltmak hastalıkların önleyici ve tedavi edici stratejileri için anahtar yaklaşımdır (Bains ve Hall, 2012; Maulik ve Kumar, 2012). Antioksidan bileşikler aktivitelerini hidrojen transferi ve elektron bağışı mekanizmaları ile uygularlar. Bununla birlikte, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve troloks eş değeri antioksidan kapasite (TEAC) gibi yaygın olarak kullanılan antioksidan yöntemlerde her iki mekanizmanın aynı anda ortaya çıkması nedeniyle yöntemlerin sınıflandırılması zordur (Barba vd., 2013).

Fermente gıdaların, hidrolizatların, fraksiyonların ve çeşitli kaynaklardan izole edilmiş peptitlerin antioksidan kapasitesini karakterize etmek için uygulanan çeşitli yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemler şunlardır: i) 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS); ii) DPPH; iii) hidroksil ve süperoksit anyon radikal süpürme etkinliği; iv) ferrik indirgeyici antioksidan gücü (FRAP); v) metal şelatlama aktivitesi; ve vi) oksijen radikal soğurma kapasitesi (ORAC).

Genel olarak, peptitlerin antioksidan özellikleri çoğunlukla serbest radikalleri (DPPH, hidroksil, süperoksit) süpürme, demiri indirgeme, metalleri bağlama (lipitleri inhibe etme) ve lipid oksidasyon önleme kabiliyetine dayanarak belirlenir. Bununla birlikte, çeşitli gıda proteini kaynaklı peptitlerin antioksidan potansiyelini tahmin etmek için hücre kültürünü ve hayvan deneylerini kullanan az sayıda çalışma vardır.

In vitro antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin varlığı kakao tohumu hidrolizatlarında bildirilmiştir (Tovar-Pérez, Guerrero-Becerra ve Lugo-Cervantes, 2017).

2.2.5. Biyoaktif peptitlerin kullanımı

Biyoaktif peptitler, insanlar tarafından tüketildiğinde sağlık üzerinde olumlu etki sağlayan ve vücutta çok sayıda potansiyel fizyolojik fonksiyon gösteren protein parçalarıdır (Kaur vd., 2020). Bu peptitler, gastrointestinal sindirim sırasında enzimatik proteoliz ile serbest bırakılır. Gıda kaynaklı peptitler, gıda sınıfı proteolitik enzimlerin kullanımı ve proteinlerin hidrolizi ile salınabilir ve ayrıca gıdaların işlenmesi (pişirme, olgunlaşma ve fermantasyon) sırasında hidrolizatlarda küçük biyoaktif peptit parçaları elde edilebilir (Abdel-Hamid vd., 2017). İzole edilmiş peptitlerin biyoyararlanımı proteinlere uygulanacak olan hidroliz derecesine bağlıdır. Kardiyovasküler hastalıklar, tansiyon, diyabet, kanser gibi hastalıkların küresel düzeyde yaygınlığı vardır ve bu hastalıkların doğrudan tedavisi her zaman ilaç toksisitesine yol açabilecek farmasötik bir yaklaşım olmuştur (Girgih vd., 2014).

Tablo 2.2.5.1’de farklı protein kaynaklarından enzimatik hidroliz ile üretilen biyoaktif peptitleri içeren ticari ürünler verilmiştir.

Tablo 2.2.5.1: Farklı protein kaynaklarından enzimatik hidroliz ile üretilen biyoaktif peptitleri içeren ticari ürünler (Nasri, 2017; Carrasco-Castilla vd., 2012; Hayes ve Tiwari, 2015)

Ürün Adı	Ürün Formu	Kaynak	Biyoaktif Peptitler	Biyoaktif Etkileri	Üretici
Calpis®	Ekşi süt	Süt	IPP, VPP	Tansiyonda azalma	Calpis Co. Ltd, Japonya
Calpis®	Tablet	Süt	IPP, VPP	Tansiyonda azalma	Calpis Co. Ltd, Japonya
Alpha-lactalbumin	Peynir altı suyu proteini izolatu	Süt	α -lactalbumin	Uykuya dalmaya ve hafızaya yardımcı	Davisco Foods International Inc., ABD
Vasotensin®	Kapsül	Palamut	LKPNM	Hipotensif	Metagenics Inc., ABD
Lapis Support™	İçecek	Sardalya	VY	Antihipertansif	TokiwaYakuhin Co Ltd, Japonya
StayBalance RJ	İçecek	Arı sütü	VY, IY, IVY	Antihipertansif	Api Co., Ltd., Gifu- City, Japonya

Trident xtra care™	Sakız	Süt	Kazein fosfopeptitleri	Çürük önleme	Cadbury Adams, ABD
HI-NUTE series	Bileşen	Soya	Soya proteini oligopeptitleri	Obeziteyi ve kas yorgunluğunu önlemeye yardımcı	Fuji Oil Co. Ltd., Japonya
Remake CholesterolBlock	İçecek	Soya	CSPHP	Kolestrol düşürücü	Kyowa Hakko, Tokyo, Japonya
Bunaharitake	Toz	Mantar	Çok sayıda peptit	Antihipertansif	Yakult Health Foods Co., Ltd., Tokyo, Japonya
Goma Pepucha	İçecek	Susam	LVY	Antihipertansif	Suntory Beverage & Food Ltd., Tokyo, Japonya
Wakame Jelly	Jöle	<i>Undaria pinnatifida</i> (deniz yosunu)	FY, VY, IY	Antihipertansif	Riken Vitamin, Tokyo, Japonya
Mainichi Kaisai Nori	Toz	<i>Porphyra yezoensis</i> (deniz yosunu)	AKYSY	Antihipertansif	Shirako Co., Ltd., Numazu City, Japonya

Biyoaktif peptitler, fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler yanında ilaç ve kozmetik ürünler üretmek için de kullanılmaktadır. Biyoaktif peptitler, daha küçük boyutlarından dolayı dokulara daha yüksek nüfuz etme kabiliyetine sahiptir. Ayrıca terapötik etkileri olan peptitler, rekombinant proteinlerden ve antikorlardan genellikle daha az immünojeniktir (Vlieghe vd., 2010). Bununla birlikte, peptit bazlı ilaç endüstrisinde, fiziksel ve kimyasal kararsızlık, *in vivo* kısa yarılanma ömürleri ve düşük oral biyoyararlanım gibi operasyonel engellerle karşılaşılabilir ve bunların bir kısmı, stabiliteelerini ve biyoyararlanımlarını arttırmak için ilaçların kapsüllenmesiyle aşılabılır (Kadam vd., 2015). Ayrıca, ilaç endüstrisinde antimikrobiyal peptitlerin kullanımı, yüzey enfeksiyonlarını tedavi etmek için topikal uygulamalarla sınırlıdır. Bununla birlikte, tam sentetik peptitler ve peptidomimetikler (peptitleri taklit eden sentetik moleküller) gibi son gelişmeler, teknolojik engellerin peptit bazlı ilaç yapım endüstrisinden kurtulması için yeni yollar açmıştır (Vlieghe vd., 2010; Narayana ve Chen, 2015). Öte yandan, doğal biyoaktif peptitler, ilaç yapımından ziyade kozmetik endüstrisinde daha fazla ilgi görmüştür. Biyoaktif peptitler, kollajeni uyarma ve botoks benzeri anti-kırılgılık etkisi oluşturma yetenekleri nedeniyle cilt bakımı ve kozmetik dermatolojide özellikle vurgulanmıştır (Fields vd., 2009).

Başta süt proteinlerinden türetilen peptitleri içeren antihipertansif ürünlerle ilgili olarak, çoğu araştırma IPP ve VPP tripeptitleri ve dodekapeptid FFVAPFPEVFGK üzerine odaklanmıştır. Japonya, fonksiyonel gıdaların izin verilen sağlık iddiaları ile ilgili olarak yasal bir sistem benimseyen ilk ülke olmuştur. 1991'de FOSHU (Özel Sağlık Kullanımı için Gıda) lisans sistemi ile ilk fonksiyonel ürünler piyasaya sürülmüştür. Valtiron® veya Vasotensin®, Japonya'da antihipertansif ajanlar olarak FOSHU onayı almıştır. Avrupa Komisyonu'nun Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ise, sağlık iddialarının iyi kanıtlanması ve neden-sonuç ilişkisinin açık bilimsel kanıtlarla gösterilmesi gerektiğini belirtmiştir. EFSA bugüne kadar palamut peptitlerinin (LKPNM26) veya lakto-tripeptitlerin (IPP, VPP) tüketimi ile normal tansiyonun sürdürülmesine ilişkin hiçbir neden-sonuç ilişkisinin gösterilmediğini beyan etmiştir. Gıda kaynaklı biyoaktif peptit araştırmalarındaki diğer bir dezavantaj, birçok biyoaktif peptit üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarının tutarsız olmasıdır. Örneğin, IPP ve VPP'nin antihipertansif kabiliyeti için, lakto-tripeptitlerin Japonlarda

tansiyonu düşürmede etkili olduğu, ancak Avrupalılarda olmadığı için tartışmalı sonuçlara neden olmuştur (Fekete, Givens ve Lovegrove, 2015).

2.3. Fındık

Fındık, *Fagales* takımının *Betulaceae* familyasının *Coryleae* alt familyasının, *Corylus* cinsine girmektedir. Meyvecilik bakımından önemli olan ve ekonomik olarak kültürü yapılan türler, *Corylus avellane* L. (Adi fındık), *Corylus colurna* L. (Türk fındığı) ve *Corylus maxima* Mill. (Lambert fındığı) olarak sıralanabilir. Ayrıca çeşitli türlerin melezleri önem kazanmaktadır. Ülkemiz ekonomisinde oldukça önemli bir yeri olan fındık başta Giresun, Ordu, Trabzon ve Rize olmak üzere Karadeniz’e kıyısı olan hemen her ilde yetiştirilmektedir (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2020).

Türkiye’de yetiştirilen 18 farklı fındık çeşidi vardır (İslam, 2018). Bunlar arasında ağırlıklı olarak Giresun ilinde yetişen Tombul fındık, birinci sınıf kalite (Giresun kalitesi); geri kalan çeşitler ikinci sınıf kalite (veya Levant kalitesi) olarak sınıflandırılır (Alaşalvar vd., 2003; İslam, 2018). Dolayısıyla, Tombul fındık dünya çapında en önemli ticari çeşit olarak kabul edilmektedir (İslam, 2018).

Türkiye’de 18 standart fındık çeşidi içinde on beşi eski tescilli çeşitlerdir. Farklı fındık türlerinden bazılarının ait görseller Şekil 2.2’de verilmiştir. Türkiye’nin en önemli fındık çeşidi “Tombul”dur. Türk fındık çeşitleri 3 pomolojik grupta toplanmaktadır (Ayfer, Uzun ve Baş, 1986). Bu gruplar ve standart çeşitler şöyledir:

Yuvarlak grup: Allahverdi, Cavcava, Çakıldak, Foşa, Giresun melezi, Kalınkara, Kan, Kara, Kargalak, Mincane, Okay 28, Palaz, Tombul, Uzunmusa

Sivri uçlu grup: Sivri, İncekara

Uzun Grup: Yuvarlak badem, Yassı badem



Şekil 2.2: Farklı fındık türleri (FİSKOBİRLİK Kalite Kontrol Laboratuvarı, Giresun)

Türk fındık çeşitleri, dünyada yetiştirilen diğer çeşitlerle karşılaştırıldıklarında, yüksek tane yüzdesi, yüksek yağ içeriği ve yüksek zar atımı dâhil olmak üzere yüksek kaliteleriyle karakterizedir (Thompson, 1982). En yüksek kalite, Tombul çeşidindedir. Çakıldak, Foşa, Mincane, Palaz, kültürde yaygın olarak kullanılan diğer önemli çeşitlerdir (Okay vd., 1986; İslam ve Özgüven, 2000).

Tombul fındığın kalite açısından Türkiye ve dünyada bilinen en önemli fındık çeşidi olduğu bildirilmiştir (Thompson, 1982; Ayfer, Uzun ve Baş, 1986; İslam ve Özgüven, 2000). İnce kabuklu, yüksek yağ içeriği ve en yüksek tam beyazlatma oranı (%100'e yakın) dikkat çekicidir. Giresun, Trabzon ve Ordu'da yetiştirilmektedir. Kabuk dolu ve yuvarlak şekildedir. Ortalama boyut 17-18 mm, ağırlık 1,5-2,0 g ve kabuk kalınlığı yaklaşık 1 mm'dir. Çekirdek yüzdesi %52-54 aralığında değişmektedir. Şekil 2.3'te tescillenmiş Tombul fındığının fiziksel özellikleri görülmektedir. Yağ içeriği yaklaşık olarak %70'tir. Genellikle, dıştaki kabuksu kısım 3-4 parça hâlinde oluşur ve uzunluğu kabuktan 2,5 kat daha uzundur (Okay vd., 1986; İslam ve Özgüven, 2000).



Şekil 2.3: Tombul fındık fiziksel görünümü (Fındık Araştırma Enstitüsü, 2020)

Ayrıca, Türk fındık çeşitleri ticari fındık özellikleri açısından iki farklı şekilde kategorize edilmektedir:

Giresun kalitesi: Piraziz ve Çarşıbaşı arasında yetiştirilen Tombul fındık çeşidine Giresun kalitesi denir. Yüksek yağ oranı, ince kabuğu ve yüksek zar atma özelliğine sahiptir.

Levant kalitesi: Giresun kalitesi dışında, ilde yetiştirilen tüm çeşitleri kapsar. Örneğin, yetiştigi yere göre Ordu'da yetişen Levant Ordu; Levant Samsun, Levant Sakarya vb. şeklinde isimlendirilir ve Giresun kalitesinden daha düşük kalitededir (Turan ve İslam, 2018).

Fındık (*Corylus avellana* L.), özellikle çikolata ve şekerleme ürünlerinde, ayrıca yemeklik yağ üretimi için bir ham madde biçiminde yaygın gıda bileşeni olarak kullanılmaktadır. Fındık çeşitliliğe bağlı, 100 gramda %55-65 yağ, %13-15 protein ve %5-12 karbonhidrat içerir (Türkomp, 2020). Yağ üretimi için fındıkların preslenmesi ve yağın çıkarılmasından sonra elde edilen fındık posası, genellikle bir yem maddesi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek besin değeri onu gıda uygulamaları için potansiyel bir ham madde hâline getirebilir. Hem ekonomik açıdan avantajlı olması hem de vejetaryen eğilimlerin artması posaları alternatif protein kaynağı hâline getirmiştir (Aydemir vd., 2014). Farklı çalışmalarda fındık posalarında %35-41 (Yağcı ve Göğüş, 2008) ve %40 (Doğan ve Bircan, 2010) gibi değişen oranlarda protein tespit edilmiştir. Fındığın, toplam lipit içeriği, Lys ve Trp hariç tüm esansiyel amino asitleri

içerir (Alaşalvar vd., 2003). Fındığın, yüksek antioksidan kapasite sergileyen flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler dâhil olmak üzere yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir (Pelvan vd., 2018).

Tablo 2.3.1’de Türkiye’de yetişen farklı fındık (*Corylus avellana* L.) çeşitlerinin bileşim değerleri yer almaktadır. Farklı fındık çeşitlerinin bileşimine bakıldığında ortalama %4,3 nem, %2,3 kül, %61,6 yağ ve %17,4 protein içeriğine sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 2.3.1: Türkiye’de yetişen farklı fındık (*Corylus avellana* L.) çeşitlerinin bileşim değerleri (Köksal vd., 2006)

Tür	Nem (%)	Kül (%)	Yağ (%)	Protein (%)
Acı	4,09	2,22	63,41	16,63
Cavcava	5,25	2,72	56,07	20,83
Çakıldak	4,86	2,60	60,67	19,44
Foşa	4,46	2,25	59,50	15,75
İncekara	4,27	2,41	60,75	16,28
Kalınkara	4,14	1,87	68,52	11,73
Kan	3,41	2,13	63,05	16,98
Karafındık	3,49	1,90	67,75	15,58
Kargalak	4,39	2,37	59,57	15,23
Kuş	4,41	2,30	61,25	16,80
Mincane	4,71	2,43	57,95	19,96
Palaz	4,76	2,61	57,65	18,03
Sivri	4,78	2,30	63,89	18,73
Tombul	4,63	2,43	64,60	17,51
Uzunmusa	4,17	2,34	61,75	16,98
Yassı badem	3,56	2,42	63,48	17,86
Yuvarlak badem	4,61	2,46	58,35	20,84

Ülkemizde fındık yağı üretimi sonucu ortaya çıkan zengin içerikli posanın büyük miktarı 0,85 TL/kg gibi çok düşük fiyatlarla ve genellikle yem sanayinde kullanılmak üzere satılmaktadır (TMO, 2019). TS 323 (2003) standardına göre fındık posasının olması gereken değerleri Tablo 2.3.2’de verilmiştir.

Tablo 2.3.2: Fındık posasına ait standart değerleri (TS, 2003)

Özellik	% Miktar
Rutubet, %, en çok	12,0
Ham protein, % (m/m), en az	41,0
Ham yağ, % (m/m), en çok	3,0
Ham selüloz, % (m/m), en çok	10,0
Ham kül, % (m/m), en çok	9,0
Yabancı madde, % (m/m), en çok	1,0
Aflatoksin B ₁ , µg/kg, en çok	50,0

Fındıktan ekstraksiyon ile yağ çıkarıldıktan sonra kalan kısım olan posa protein (%35-41), lif (%10) ve çeşitli fonksiyonel bileşenlerin üretimi için zengin bir bileşime sahiptir (Turan, Altay ve Güven, 2015). Ayrıca, fındık posasının fırıncılık ürünleri, şekerleme, tahıl, salata, sos, tatlı ve süt formülasyonlarında lezzet ve dokuya katkıda bulunduğu bilinmektedir (Dervişoğlu, 2006). Fındık, gıda endüstrisinde şekerlemede (çikolata, nuga kurabiyeleri, pralin, doğranmış fındık, fındık ezmesi ve kahvaltılık tahıllar) veya işlenmiş formülasyonlarda (pralin ezmesi ve fındık yağı) bir bileşen olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Platteau vd., 2011). Fındık sadece tüm dünyada atıştırmalık olarak tüketilmekle kalmaz, aynı zamanda çikolata ve fırıncılık ürünleri gibi çeşitli gıda ürünlerinin formülasyonlarına bir bileşen olarak dâhil edilir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından fındıkların kalp dostu gıdalar olarak tanınması hoş tadı, yüksek besin değeri, sağlığı teşvik edici etkileri fındığın daha fazla araştırılmasını sağlamıştır (FDA, 2003).

2.3.1. Dünya fındık pazarı ve Türkiye

Fındık, dünyada yaygın yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyveler arasında rekolte açısından ikinci sıradadır. Dünya fındık üretimi, 1960'lı yıllarda yaklaşık 250.000 ton civarında iken son yıllarda 1 milyon tonu geçmiştir (FAO, 2018). Ülkemizde fındık üretimi genel olarak Karadeniz Bölgesi'nde gerçekleştirilmektedir. Ülkemiz, yıllara göre değişiklik göstermekle beraber, son on yıllık ortalama göre 570.000 tonluk fındık üretimi ile dünya üretiminin yaklaşık %70'ini karşılamaktadır (TÜİK, 2020). Türkiye'nin ortalama dekara fındık verimi 77 kg'dır. Türkiye İstatistik Kurumu (2020), verilerine göre 2001 yılında 555.000 hektar olan fındık ekim alanları, 2019

yılında yaklaşık 734.000 hektara ulaşarak 2001 yılına oranla %32'lik bir artış göstermiştir. 2018 yılında dünya genelinde 976.200 hektarlık bir alanda fındık üretimi yapıldığı tahmin edilmektedir. Türkiye'de yaklaşık 700.000 hektar alanda fındık üretimi yapılmakta olup, dünya fındık üretim alanlarının %75'i ülkemizde bulunmaktadır. Türkiye'yi %8'lik payla İtalya takip etmektedir (INC, 2020).

Fındık dünyada, süt, fırıncılık, şekerleme ve çikolata ürünlerinde lezzet sağlamak için doğal, beyazlatılmış ve kavrulmuş olarak veya dilimlenmiş, doğranmış, un, yağ gibi ürünler olarak tüketilmektedir (Köksal vd., 2006). Dünya fındık tüketiminin ortalama 1 milyon ton civarında olduğu tahmin edilmektedir. Fındığın %70'i çikolata sanayinde, %20'si pastane ve bisküvi mamullerinde, %10'u ise kuru yemiş ve yağ sanayinde ham madde olarak kullanılmaktadır (TMO, 2019). Dolayısıyla fındığa olan talep artışı şekerleme ve çikolata sanayisinin büyümesine ve bu sanayide fındığın tercih edilmesine bağlanmaktadır. Fındığın temel gıda maddesi olmaması, ihracat fiyatlarının belirli senelerde yüksek olması ve üretiminin ülkemiz dışında sınırlı olması sebebiyle çoğu ülkede fındık ve mamulleri yüksek fiyatlardan tüketilmektedir (TMO, 2019).

Dünya fındık üretiminde ilk sırada yer alan ülkemiz fındık tüketiminde oldukça düşük düzeyde kalmaktadır. Ülkemizde yılda 80.000 ton civarında fındık tüketilmektedir. Antep fıstığı, badem, ceviz ve kestane gibi ikame ürünlerin çok olması, tüketimi arttırmaya yönelik çalışmaların yetersizliği, fındığın kullanım alanlarının yaygınlaştırılamaması, halkın alım gücünün yetersizliği gibi birçok faktörler iç fındık tüketiminin artışını olumsuz yönde etkilemektedir. Günümüzde üretilen fındığın sadece %11-12'lik kısmı iç pazarda tüketilmekte ve kişi başına yıllık tüketim miktarı da 500-600 gram civarında kalmaktadır (GTB, 2015).

FAO (2017) verilerine göre dünya fındık ihracatı 2012-2016 döneminde ortalama 210.000 ton (kabuklu fındık cinsinden) olup, bunun %75'ini Türkiye gerçekleştirmiştir. Dünya fındık üretim ve ihracatının çok önemli bir kısmını Türkiye'nin sağlamasından dolayı, iç piyasada uyguladığı politikaların dünya piyasaları ve fiyatlarına etkisi fazla olmaktadır (TMO, 2019). Fındık ihracatı, tarım ihracatı gelirlerinin %12'sini, genel ihracat gelirlerinin %1,5'ini oluşturmaktadır (TÜİK, 2016).

Son 10 yıllık ihracat ortalamamız, 240.000 ton iç karşılığı 480.000 ton kabuklu fındık olarak gerçekleşmiş olup ülkemiz ekonomisinde önemli bir yeri olan fındık, ihracat geliri ile de ekonomimize önemli katkı sağlamamıştır (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2020). Tablo 2.3.1.1’de de görüldüğü gibi ülkeler itibariyle fındık ihracatımızın seyri incelendiğinde; ihracatımızın büyük bir kısmının belli ülkelerde yoğunlaştığı ve belirli pazarlara bağımlı olduğu gözlemlenmektedir. Önemli bir kısmı Avrupa Birliği üyesi olan ve Batı Avrupa’da yer alan bu ülkeler, aynı zamanda dünyanın en büyük çikolata üretici ülkeleri ve pazarlarıdır. 2019 yılında fındık ihracatımızdaki ilk beş ülkenin oranları yaklaşık olarak; İtalya (%37), Almanya (%21), Fransa (%7), Polonya (%4) ve Hollanda (%3) olarak gerçekleşmiştir (Tablo 2.3.1.1).

Tablo 2.3.1.1: 01/01/2019-31/12/2019 tarihleri arasında kayda alınan Türkiye fındık ihracatı (KİB, 2019)

Ülke	Miktar (kg)	Değer (\$)
İtalya	83.898.520	547.588.343
Almanya	73.476.862	434.806.336
Fransa	22.719.142	147.075.924
Polonya	11.985.671	80.789.244
Hollanda	11.205.783	69.661.674
Çin	11.180.220	87.179.023
Avusturya	9.349.394	52.022.442
İsviçre	9.180.667	54.601.023
Kanada	8.565.887	60.698.605
İspanya	7.841.822	48.319.145
Diğerleri	70.368.456	445.986.213
Toplam	319.772.424	2.028.727.972

Türler itibariyle son yıllarda fındık ihracatımızın seyri incelendiğinde, ihracatımızın hemen hemen tamamına yakınının işlenmiş veya iç fındık şeklinde ihraç edildiği (%63 iç fındık, %21 ileri işlenmiş fındıklar, %16 işlenmiş bütün hâlde fındıklar) görülmektedir. Bu eğilimde, ülkemizin sahip olduğu modern kırma ve işleme tesislerinin alıcı ülke standartlarına uygunluğu ve nakliye masraflarından sağlanan tasarruf, belirleyici role sahip bulunmaktadır (TMO, 2019).

Fındık işleme sanayinin ürünleri üç gruba ayrılmaktadır (TMO, 2019). Birinci jenerasyon ürünler: kavrulmuş, beyazlatılmış, kıyılmış, dilimlenmiş, toz ve ezme fındık çeşitleridir. İkinci jenerasyon ürünler: fındık fureleri, krokanlar ve nugatlardır. Üçüncü jenerasyon ürünler: fındık filipsleri, fındık drajeleri, araştırmaları süren diğer ürünlerdir.

Birinci ve ikinci jenerasyon ürünler daha çok yarı mamul olarak ihraç edilmektedir. Üçüncü jenerasyon ürünler için çalışmalar sürmektedir (TMO, 2019). Fındık yakın yıllara kadar sadece kabuklu ve iç olarak yurt dışına ihraç edilirken bugün ihracatın önemli bir bölümü işlenmiş olarak yapılmaktadır.

2.3.2. Fındık proteinleri ve peptitleri

Fındık proteinleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Fındık proteini, tohumun en büyük kısmını oluşturur ve farklı protein gruplarında sınıflandırılabilir: cupin süper ailesi, prolamin süper ailesi, polenle ilgili proteinler ve koruyucu proteinler (Nitride vd., 2017). Farklı fındık çeşitlerinde genetik faktörler, iklim koşulları gibi nedenler fındığın protein oranında ve amino asit kompozisyonunda farklılığa yol açabilir (Fan vd., 2020).

Fındık posası, bitkisel yağların üretiminde ortaya çıkan başlıca yan ürünlerdendir ve bitkisel kaynaklı peptit ürünlerinin üretilmesi için düşük maliyetli bir kaynak oluşturmaktadır. Çeşitli çalışmalarda fındık proteini konsantrelerinden enzimatik muamele ile biyoaktif peptitler üretilerek ilgili peptitlerin biyolojik etkinlikleri incelenmiştir.

Tatar, Tunç ve Kahyaoğlu (2015) tarafından yapılan çalışmada, iki farklı yöntemle elde edilen fındık (*Corylus avellana* L.) posalarından üretilen protein konsantrelerinin fonksiyonel, reolojik özellikleri belirlenmiş ve ekstraksiyon tipinin fındık proteininin özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Posalara göre onlardan elde edilen proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde iyileşme görülmüştür. Bunun nedeni, pH değerinin fındık proteini çözünürlüğünü etkilemesi ve alkali pH koşullarında, asidik pH değerlerine göre daha yüksek çözünürlük göstermesidir. Sıcak ekstraksiyonla elde edilen posa ve proteinin soğuk pres yöntemiyle elde edilene göre emülsifiye edici stabilitesinin, yağ tutma kapasitesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Badem, kaju, am fıstığı gibi yağlı tohum proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinin incelendiği çalışmada, fındık proteinlerinin test edilen örnekler arasında en az köpüklenme kapasitesine ve stabiliteye sahip olduğu görülmüştür (Sharma vd., 2010). Test edilen örneklerin köpükleme kapasitelerindeki farklılıkların sadece protein miktarına bağlı olmadığı düşünülmektedir.

Aydemir vd. (2014), farklı protein izolasyon yöntemlerinin (alkali ekstraksiyonu, sıcak ekstraksiyon, asetonla yıkama, asetonla yıkama ve sıcak ekstraksiyon) fındık (*Corylus avellana* L.) posalarından izole edilmiş proteinlerin biyoaktif, fonksiyonel ve yenilebilir film yapma özelliklerine etkisini incelenmiştir. Farklı şekilde izole edilen fındık proteinlerinde antioksidan aktivite (TEAC ve ORAC: 158-461 mmol troloks/kg), demir şelatlama (60,7-126,7 mmol EDTA/kg), ACE inhibisyonu (IC₅₀: 0,57-1,0 mg/ml), kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivite (IC₅₀: 3,0-4,6 mg/ml) gibi biyoaktif özellikler tespit edilmiştir. İzole edilmiş fındık posası proteinlerinin yüksek yağ tutma kapasitesi ve köpürme özelliklerine rağmen düşük su tutma kapasitesi, jelleşme kapasitesi ve emülsiyon stabilitesi nedeniyle endüstriyel kullanımında zorluklar oluşturabileceği ifade edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, fındık proteinlerinin biyoaktif, çözünürlük ve jelleşme özelliklerinin asetonla yıkama ve/veya ısıl işlem gibi basit işlemlerle iyileştirilebileceğini, dolayısıyla biyoaktif fındık proteinlerince zengin içecek, fındık kreması, şekerleme gibi ürünler geliştirilebileceğini göstermiştir.

Liu vd. (2018a), fındık (*Corylus heterophylla* Fisch.) proteinlerinin alkalaz ile hidrolizinden sonra iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile saflaştırılan ACE inhibitör peptitlerini sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) ile tanımlamıştır. Bu peptitlerin etkisini açıklayabilmek için ACE inhibisyon kinetiği, *in vitro* ve *in vivo* biyoyararlanım deneyleri, aktif bölge analizi, inhibitör peptitler ile ACE arasındaki etkileşim incelenmiştir. Yeni ACE inhibitör peptitleri Ala-Val-Lys-Val-Leu (IC₅₀: 73,06 M), Tyr-Leu-Val-Arg (IC₅₀: 15,42 M) ve Thr-Leu-Val-Gly-Arg (IC₅₀: 249,3 M) olarak tespit edilmiştir. Tüm peptitler, rekabetçi olmayan bir yolla ACE aktivitesini inhibe etmiştir. *In vivo* veriler Tyr-Leu-Val-Arg uygulamasının kendiliğinden hipertansif sıçanlarda sistolik tansiyonu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, bu peptitlerin, hipertansiyon tedavisi için sağlığı

olumlu etkileyen fonksiyonel gıdalarda nutrasötikler olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Liu vd. (2018b) tarafından, yabani findık (*Corylus heterophylla* Fisch.) proteininden alkalaz ile üretilen hidrolizatlardan en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan fraksiyonu, jel filtrasyon ve RP-HPLC ile saflaştırılmıştır. Hücre canlılığı deneyi, fraksiyonun hiçbir sitotoksik etkisi olmadığını göstermiştir. Antioksidan peptidin fonksiyonel özellikleri hakkında daha fazla bilgi edinmek için fraksiyon, LC-ESI-MS/MS ile sekanslanmıştır ve peptitler sırasıyla Ala-Asp-Gly-Phe (408,16 Da), Ala-Gly-Gly-Phe (350,16 Da), Ala-Trp-Asp-Pro-Glu (616,25 Da), Asp-Trp-Asp-Pro-Lys (659,29 Da), Glu-Thr-Thr-Leu (462,23 Da) ve Ser-Gly-Ala-Phe (380,17 Da) olarak tanımlanmıştır. Altı yeni peptit kimyasal olarak sentezlenmiştir, bunların antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi ile değerlendirilmiştir. Altı peptidin hepsi çok yüksek oranda antioksidan aktivite göstermiştir. Özellikle, Ala-Asp-Gly-Phe, aralarında en güçlü etkinlik gösteren radikallere sahiptir. Sonuçlar, antioksidan diyet biyoaktiviteleri, gıdaların korunması ve oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların tedavisi için ilaç formülasyonları olarak findık antioksidan peptitlerinin dâhil edilmesine katkıda bulunabilir.

2.3.3. Fındık proteinlerinin hidrolizinde kullanılan enzimler

Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar, proteinler ve peptitlerdeki peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştiren bir grup hidrolitik enzimdir. Proteazlar esas olarak ekzo- ve endo- peptidazlar olarak bilinen iki grup enzimi içerir. Ekzopeptidazlar amino veya karboksil uçlarında etki gösterirken endopeptidazlar substrat olarak kullanılan protein dizisinin iç kısmında etkinlik gösterir.

Çalışmada findık proteinlerinin enzimatik hidrolizi için papain (EC 3.4.22.2), bromelain (EC 3.4.22.32) ve pepsin (EC 3.4.23.1) proteazları kullanılmıştır. Papain ve bromelain sistein proteazları sınıfına, pepsin aspartik proteaz sınıfına dâhil edilir. Papain ve bromelain bitkisel kaynaklı gastrointestinal olmayan enzimlerdir ancak pepsin hayvansal kaynaklı gastrointestinal bir enzimdir.

Enzimatik hidroliz, biyoaktif peptit üretimi için en yaygın olarak kullanılan işlemdir. Sıklıkla kullanılan çoğu ticari enzimatik preparat, hayvansal (örn., tripsin ve pepsin) ve mikrobiyal (örn., alkalaz ve nötraz) kaynaklardan elde edilir (Mazorra-Manzano,

Ramírez-Suarez ve Yada, 2018). Bitki proteazlarının kullanımı papayadan elde edilen papain ve ananastan elde edilen bromelain ile kısmen sınırlı olmasına rağmen, yeni bitki proteazlarının uygulanması artmaktadır. Literatürde yer alan 150 biyoaktif peptit üretimi içeren araştırmanın incelendiği bir değerlendirmede, makalelerin yaklaşık %75'inde üç hayvansal kaynaklı enzim (pepsin, tripsin ve kimotripsin) ve üç mikrobiyal kökenli enzim (alkalaz, flavorzim ve nötraz) kullanıldığı tespit edilmiştir (Mazorra-Manzano, Ramírez-Suarez ve Yada, 2018). Bitki proteazlarına atıf, genelin sadece %15'ini oluşturmakla beraber papain ve bromelaine yapılan atıflar bu referansların yaklaşık %75'ini kapsamaktadır.

Proteazlar, proteinler üzerindeki spesifik kesme bölgeleri nedeniyle bu süreci optimize etmek için merkezi bir rol oynar. Örneğin, tripsin (omurgalıların sindirim sistemindeki doğal oluşumun proteazı), sadece Arg veya Lys varlığında C- terminalinin peptit bağlarını ayırır (Olsen, Ong ve Mann, 2004). Alkalaz (*Bacillus licheniformis* tarafından üretilen), Glu, Met, Leu, Tyr, Lys ve Gln içeren peptitlerin üretimi nedeniyle diğer enzimlere göre daha geniş bir özgüllük sergiler (Adamson ve Reynolds, 1996). Pepsin (İnsanların ve birçok hayvanın midesinde bulunur.), fenilalanin ve lösinden sonra peptit bağını ayırır (Hamuro vd., 2008). Pankreatin (lipaz, amilaz ve proteolitik enzimlerin bir kombinasyonu), tercihen N- terminal fosforilatlanmış bölgede ve C- terminal hidrofobik bölgelerinde peptit bağlarını koparır (Su vd., 2012). Papain (Doğal olarak papayada bulunur.), Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp ve Tyr amino asitlerini içeren hidrofobik bölgelerin peptit bağlarını parçalar (Schechter ve Berger, 1968). Çoğu hidrolitik işlem bir seferde bir proteaz kullanır; bununla birlikte, farklı spesifisiteye sahip iki enzimin bir kombinasyonu da araştırılmıştır (Zeng vd., 2008). Bazen kısmen hidrolize olan proteinler, gastrointestinal sindirimi simüle etmek için pepsin ve tripsin ile de muamele edilir (Tavares vd., 2011; Papillo vd., 2014).

Protein hidrolizinin süreci genellikle hidroliz derecesi ile takip edilir. Oluşan peptitlerin sayısı veya miktarı, biyoaktif peptitlerin sayısı ve miktarı ile ilişkili olmayabilir (Toldrá vd., 2018). Hidroliz verimliliği; protein substratı, proteazların tipi ve özgüllüğü, hidroliz derecesi ve ayrıca tüm hidrolitik süreç boyunca peptitlerin stabilitesi gibi faktörlere bağlıdır (Zarei vd., 2012; 2016; Tavares vd., 2011; Dos Santos vd., 2011). Alkalaz ile hidrolize edilen mercimek protein konsantreleri, savinaz

ile hidroliz edilen protein konsantrelerinden daha yüksek peptit verimi vermesine rağmen, daha az biyoaktivite göstermektedir (Garcia-Mora vd., 2014). Bu nedenle, her bir protein türü ve hedef peptit biyoaktivitesi için en uygun peptidaz seçimi dikkatle incelenmelidir. Geniş substrat spesifitesine sahip proteazlar genellikle hidrolitik işlem sırasında öngörülemeyen parçalanma ürünleri oluşturur, ancak bunların kullanımı, küçük parçaların aktiviteye sahip olabileceği yüksek hidroliz derecesine sahip hidrolizatların üretiminde tercih edilmektedir (Barbana ve Boye, 2011).

Gıda alerjisi, belirli gıdalar tüketildiğinde ortaya çıkan anormal bir immünolojik yanıt veya alerjik reaksiyondur. Gelişmiş ülkelerde yaşayan yetişkinlerin %1-2'sini ve çocukların %3-6'sını etkileyen önemli bir halk sağlığı endişesi olarak kabul edilmektedir (Jerschow vd., 2014; Rona vd., 2007). Genellikle yüz yetmişten fazla gıda alerjik reaksiyonlara neden olabilir, ancak vakaların %90'ının süt, yumurta, soya, kabuksuz/kabuklu deniz ürünleri, balık, çam fıstığı, yer fıstığı ve buğdayda bulunan alerjenik proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Shriver ve Yang, 2011; Thompson, Kane ve Hager, 2006). Çok sayıda potansiyel olarak alerjenik birey, tüketimden sonraya kadar bazı gıdalara karşı alerjik reaksiyonlarının farkında değildir. Tipik olarak, klinik semptomlar solunum problemlerini (örn., konjonktivit, rinit), cilt reaksiyonlarını (örn., ürtiker, egzama, anjiyoödem), kardiyovasküler bozuklukları (örn., vasküler kollaps, hipotansiyon) ve gastrointestinal sistemdeki problemleri (örn., kusma, ishal, karın ağrısı) içerir (Cianferoni ve Spergel, 2009). Gıda alerjisi genellikle immünglobulin E (IgE) aracılı, IgE aracılı olmayan ve karışık reaksiyon tiplerinde sınıflandırılır (Ekezie, Cheng ve Sun, 2018). Çoğu gıda alerjeni, esas olarak 10 ile 70 kDa arasında değişen, proteolitik reaksiyonlara ve ısı veya asit tedavilerine karşı kararlı olan suda çözünür glikoproteinlerdir (Sicherer ve Sampson, 2014).

Gıda proteinleri genellikle tripsin, pepsin, kimotripsin, bromelain, ficin veya papain gibi enzimler kullanılarak hidrolize edilir. Nihai üründe artık toksik kimyasalların ve organik çözücülerin bulunmaması gibi enzimatik hidroliz kullanmanın çeşitli avantajları olmasına rağmen, enzimlerin endüstriyel ölçekte kullanılması üretim maliyetini büyük ölçüde artırır.

Farklı işleme yöntemleri gıda proteinlerinin alerjenliği azaltmak veya bunları ortadan kaldırmak için uygulanabilir. Bu işlemlerden bazıları ısı işlem (Riascos vd., 2016; Van Boxtel vd., 2008), yüksek basınç uygulaması (Peñas vd., 2006) ve enzimatik

hidroliz (Cabanillas vd., 2010) şeklindedir. Üretilen parçalanmış proteine ait antijenite ve peptit tipi, pH, sıcaklık, hidroliz derecesi ve enzim-substrat oranı gibi işlem koşulları ile belirlenir (Ekezie, Cheng ve Sun, 2018).

Nohut 11S globülin proteini, sırasıyla alkalaz ve flavorzim ile hidrolize edilmiş ve hidrolizatlar, alerjenitede %90 azalma göstermiştir (Clemente vd., 1999). Kulis vd. (2012) pepsin tarafından sindirilen kaju proteinlerinin farelerde azalmış alerjenik aktivite sergilediğini göstermiştir. Fıstık alerjenlerinin tripsin ile hidrolizi bile alerjenitenin etkili bir şekilde azaldığını göstermiştir (Hazebrouck vd., 2012; Yu vd., 2011). Tahıllara örnek olarak, alkali proteazın, karabuğday proteininin alerjenitesini azaltmada oldukça etkili olduğu bulunmuştur ve immüno blotlamanın sonuçları, karabuğday proteinine karşı tavşan antiserumunun artık bir antijen olarak tanınmadığını göstermiştir (Sung vd., 2014a). Birden fazla enzim kullanmak, tek bir enzim kullanmaktan daha etkili olabilir. Örneğin, alkalaz ve flavorzim ardışık etkisi ile hidrolize edilen mercimek proteini içeren özütler, ayrı ayrı test edilen her iki enzime kıyasla IgE bağlayıcı epitopların daha yüksek yıkımıyla sonuçlanır (Cabanillas vd., 2010). Benzer enzimler (alkalaz ve flavorzim) kullanılarak börülce, siyah mercimek ve yer fıstığından ekstraktların hidrolizi, ELISA'da IgE bağlanmasının sırasıyla 62,2, 87,1 ve 91,8 oranında azalmasına neden olmuştur (Kasera vd., 2015). Buna karşılık, soya fasulyesi 2S proteininin peptik hidrolizi, alerjenitesini hafifçe azaltmıştır, ancak takiben kimotripsin hidrolizi, alerjeniteyi arttırmıştır (Sung vd., 2014b). Budseekoad vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada maş fasulyesi protein hidrolizatının flavorzim ve pankreatin kombinasyonu (%135,61), alkalaz (%121,74) ve pankreatin (%80,32) gibi farklı enzimlerle hazırlanarak antialerjik aktivitesi tespit edilmiştir.

Alternatif protein kaynağı olarak yağlı tohumların yan ürünü şeklinde ortaya çıkan posalar literatürde geniş şekilde ele alınan konulardandır. Çalışmanın literatür kısmında findık özelinde bitkisel kaynaklı protein ve biyoaktif peptit üretim metodlarından bahsedilmiştir. Ülkemiz açısından önemli bir ekonomik gelir aracı olan findık, katma değerli alternatif gıda bileşenleri üretimleri için imkân sağlayabilir. Bu bağlamda findık proteinleri, peptitleri ve sağlık üzerine olası etkileri ile ilgili literatüre katkı sağlanmak istenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

3.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan soğuk pres Giresun Tombul fıındığı (*Corylus avellana* L.) posası Oneva (Neva Gıda Ltd., İstanbul) tarafından temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmanın her aşamasında ultra saf su kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeleri; sodyum hidroksit (S5881-5KG, Sigma-Aldrich), hidroklorik asit (320331-2.5L, Sigma-Aldrich), sodyum fosfat dibazik dihidrat (04272-1KG, Sigma-Aldrich), sodyum fosfat monobazik monohidrat (71504-1KG, Sigma-Aldrich), sodyum asetat anhidrat (969.176, Isolab), asetik asit (27225-2.5L-R, Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS, 8170349020, Merck), pikrilsülfonik asit solüsyonu (2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit solüsyonu, TNBS, P2297-10ML, Sigma-Aldrich), L-Lösin (L8000-25G, Sigma-Aldrich), tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane, PlusOne, 17-1321-01, GE Healthcare Life Sciences), sodyum klorit (S9888-500G, Sigma-Aldrich), hippürik asit (HA, 68069-50MG, Sigma-Aldrich), Hippüiril-His-Leu (HHL, H1635-1G, Sigma-Aldrich), borik asit (B6768-1KG, Sigma-Aldrich), metanol (1060072500, Merck), trifloroasetik asit (TFA, T6508-100ML, Sigma-Aldrich), Kaptopril (PHR1307-1G, Sigma-Aldrich), Gly-Pro-pNA (G0513-100MG, Sigma-Aldrich), Ile-Pro-Ile (Diprotin A, Sigma I9759-25MG, Sigma-Aldrich), patates nişastası (S2004-500G, Sigma-Aldrich), 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS, D0550-10G, Sigma-Aldrich), potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (217255-500G, Sigma-Aldrich), 4-Nitrofenil α -D-glukopiranozid (pNPG, N1377-1G, Sigma-Aldrich), sodyum karbonat (13418-1KG-R, Sigma-Aldrich), 2-nitrobenzoik asit (DTNB, D8130-5G, Sigma-Aldrich), asetilkolin iyodür (A5751-1G, Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, D9132-5G, Sigma-Aldrich), ($\pm$)-6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit (troloks, 238813-5G, Sigma-Aldrich), 2,6-di-*tert*-bütil-4-metilfenol (BHT, B1378-1KG, Sigma-Aldrich), demir(II)

klorür (372870-25G, Sigma-Aldrich), 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin- mono-*p,p'*-disülfonik asit monosodyum sodyum tuzu (Ferrozine, 160601-1G, Sigma-Aldrich), etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat (EDTA, E5134-500G, Sigma-Aldrich), potasyum hekzanoferat(III) (31253-250G, Sigma-Aldrich), demir(III) klorür (ferric chloride, 157740-5G, Sigma-Aldrich), demir(II) sülfat heptahidrat (12354-1KG, Sigma-Aldrich), 2-deoksi-D-riboz (α -deoksiriboz, D5899-10MG, Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit solüsyonu (18312-1L, Sigma-Aldrich), trikloroasetik asit (TCA, 27242-1KG-R, Sigma-Aldrich), tiyobarbitirik asit (TBA, T5500-25G, Sigma-Aldrich), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS, 11557-1G, Sigma-Aldrich), potasyum persülfat (60489-250G-F, Sigma-Aldrich), pirogallol (16040-100G-R, Sigma-Aldrich), enzimsiz simüle mide sıvısı (14666-961.5ML, Fluka Analytical), enzimsiz simüle bağırsak sıvısı (68856-961.5ML, Fluka Analytical), kalsiyum klorür (746495-2.5KG, Sigma-Aldrich), safra (bile bovine, B3883-100G, Sigma-Aldrich) şeklindedir.

Çalışmada kullanılan enzimler; papain (papain from papaya latex, P4762-100MG, Sigma-Aldrich), bromelain (bromelain from pineapple stem, B4882-10G, Sigma-Aldrich), pepsin (pepsin from porcine gastric mucosa, P6887-1G, Sigma-Aldrich), ACE (Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung, A6778-0.25UN, Sigma-Aldrich), DPP-IV (Dipeptidyl Peptidase IV human, D4943-1VL, Sigma-Aldrich), alfa-glukosidaz (α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, Type I, G5003-100UN, Sigma-Aldrich), AChE (Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*, C3389, Sigma-Aldrich), alfa-amilaz (α -Amylase from human saliva, Type IX-A, A0521-2.5KU, Sigma-Aldrich), pankreatin (pancreatin from porcine pancreas, tripsin aktivitesi 625 U/mg, PB0681, Bio Basic) şeklindedir ve uygun tampon çözeltilerle belirlenen ünitelerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışmada kullanılan cihazlar; ultra saf su (tip 1) sistemi (Millipore Direct-Q 3, Merck, Almanya), elektronik kaba terazi (TP-3002, Denver Instrument, GmbH, Almanya), elektronik hassas terazi (AS 220-R2, Radwag, Polonya), çelik blender (EB 8011, Waring, ABD), etüv (UNB 500, Memmert, Almanya), kül fırını (MT-1105, Magmatherm, Türkiye), ısıtıcı tablalı çoklu manyetik karıştırıcı (Isolab, Almanya), pH metre (HI 2211-02, Hanna Instruments, ABD), yüksek hızlı soğutmalı santrifüj

(Himac CR22N, Hitachi, Japonya), mikrosantrifüj (Microfuge 20R, Beckman Coulter, ABD), liyofilizatör (TRS 2-2V, Teknosem, İstanbul, Türkiye), termomikser (MTC-100, MIULAB, Çin), vorteks (Genie-2, Scientific Industries, ABD), UV-Visible spektrofotometre (SP-3000 nano, Optima, Japonya), çalkalamalı su banyosu (WBN 14, Memmert, Almanya), ultrasonik su banyosu (Ultrasons-HD, Selecta, İspanya), -20°C dondurucu ve -80°C dondurucu şeklindedir.

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; otomatik mikropipetler (Isolab, Almanya), pipet uçları, yağsız vakum pompası (BF-S2500, Abel Industries, Kanada), cam vakumlu süzme seti (Isolab, Almanya), cam desikatör (250 mm, Isolab, Almanya), 0,45 µm gözenek çaplı PVDF (polivinilden diflorid) şırınga ucu filtre (Millex-HV, Merck-Millipore, Almanya), 0,22 µm gözenek çaplı selüloz asetat (CA) şırınga ucu filtre (Isolab, Almanya), 0,22 µm gözenek çaplı poliamid (PA) membran filtre (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya), polistiren ve kuvars spektrofotometre küvetleri (Isolab, Almanya), kaba filtre kâğıdı, porselen kroze, plastik malzemeler (petri, falkon tüp, mikrosantrifüj tüpü, enjektör), paslanmaz çelik malzemeler (spatül, kaşık), cam malzemeler (beher, erlen, şişe, joje) şeklindedir.

3.2. Metotlar

3.2.1. Fındık posanın kompozisyon analizi

Çalışmada kullanılan fındık posasının literatürdeki çalışmalar ile olan benzerliklerini ortaya koymak amacıyla protein, nem ve kül analizleri yapılmıştır. Şekil 3.1’de preslenmiş katı formda temin edilen posa, öğütülerek toz forma getirilerek ilgili analizler yapılmıştır.



Şekil 3.1: Soğuk preslenmiş fındık posası (Neva Gıda Ltd., İstanbul)

3.2.1.1. Protein analizi

Protein analizi, LTS Laboratuvar Hizmetleri'nde gerçekleştirilmiştir (hizmet alımı) ve TÜBİTAK 1001 Programı'ndan (proje no:217O063) sağlanan destek ile finanse edilmiştir. Bu analizler, söz konusu akredite laboratuvarın prosedürlerine uygun olarak Kjeldahl (NMKL 6, 2003) metoduna göre yapılmıştır.

3.2.1.2. Nem analizi

Numunelerin nem içeriği, AOAC (1990) 950.46B protokolüne göre belirlenmiştir. Bir kaptaki 2 g numune tartılarak etüvde 100–102°C'de 16–18 saat süreyle tutulmuştur. Bu sürenin sonunda numune bir desikatörde soğutulmuş ve sabit tartıma gelindiğinde oluşan ağırlık farkı, numunenin nem içeriğini hesaplamak için kullanılmıştır.

3.2.1.3. Kül analizi

Kül miktarı, organik maddenin yanmasından veya tamamen oksidasyonundan sonra inorganik kalıntıların analizine dayalı olarak AOAC (1998) 938.08 protokolüne göre belirlenmiştir. Sabit tartıma getirilen porselen krozelere 2 g numune tartılmıştır ve krozeler, 3 saat süreyle 550°C'de tutulmuştur (Şekil 3.2). Süre sonunda krozeler, soğumaları için desikatöre alınmıştır. % Kül miktarı, inorganik tortunun toplam ağırlıkla karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır.



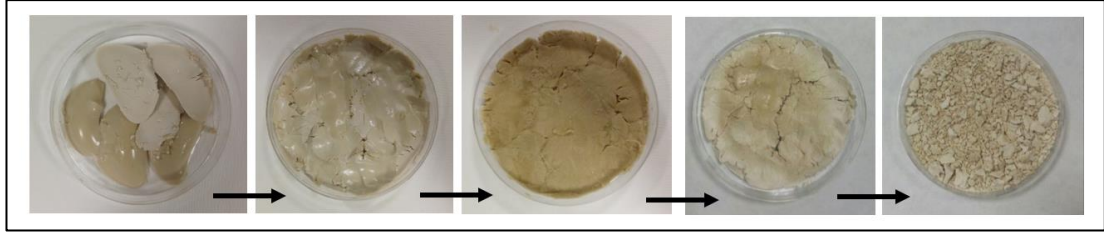
Şekil 3.2: Kül fırınında ve kül fırınından çıktıktan sonra örnekler

3.2.2. Bitkisel posalardan protein izolatlarının elde edilmesi

Fındık proteini izolatlarının eldesinde Coşkun vd. (2019) tarafından bildirilen alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemi küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Yağı alınmış fındık posaları saf su ile 1:15 (posa:su, ağırlık:hacim) oranında bir beherde karıştırılarak dispers hâle getirilmiştir. Ortamın pH değeri 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 9,5 değerinde sabitlenmiş ve dispersiyon, oda sıcaklığında 500 rpm (“revolutions per minute”, dakikada devir sayısı) karıştırma hızında 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Yüksek pH, proteinlerin çözünmesini sağlamak amacıyla uygulanmıştır. Karışım, yüksek hızlı soğutmalı santrifüj ile 25°C’de 11.000xg’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Çözünen sıvı kısım (süpernatant) bir beherde toplanarak ve 1 N HCl kullanılarak ortam pH 4,5 değerine getirilmiştir. Böylece, izoelektrik çökeltme teşvik edilmiştir ve dispersiyon tekrar, yüksek hızlı soğutmalı santrifüj ile 25°C’de 11.000xg’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak spatül yardımıyla çökelen proteinlerden oluşan pellet (çökelti) toplanmıştır. Toplanan protein izolatları bir petriye yayılarak -20°C’de dondurulmuştur. Dondurulan fındık proteini izolatlarından suyu uzaklaştırmak için petriler, liyofilizatörde tamamen kuruyana kadar bekletilmiştir (Şekil 3.3). Üretilen protein izolatları çalışmalarda kullanılmak üzere toz formda Şekil 3.4’teki gibi -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.3: Dondurulmuş numunelerin liyofilizasyonu



Şekil 3.4: Santrifüjden çıkan tüplerdeki katı kısmın petriye yayılması, dondurulması, liyofilize edilmesi ve liyofilizatörden alınan kurumuş protein izolatlarının toz forma getirilmesi

3.2.3. Protein izolatlarının proteolitik hidrolizi

Elde edilen protein izolatlarının enzimatik hidrolizi, uygun bir termomikser kullanılarak kontrollü ortamda yapılmıştır. Fındık proteini izolatlarının hidrolizinde papain, bromelain ve pepsin enzimleri kullanılmıştır. Papain, bromelain, pepsin ile hazırlanan hidrolizatlar için enzim:substrat oranı 1:100 olarak belirlenmiştir. Üç enzim için de farklı proteolitik hidroliz protokolleri ile hidrolizatlar hazırlanarak optimum koşullar FPLC sistemindeki kolon-peptit etkileşimine bağlı olarak alınan sinyal yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

Papain ile hazırlanan fındık proteini izolatu hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde pH 7,0 değerinde 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerindeki karışım için enzimatik proses karıştırıcılı termomikser kullanılarak 50°C’de 1.000 rpm karıştırma hızında 150 dakika sürdürülmüştür.

Bromelain ile hazırlanan fındık proteini izolatu hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde pH 4,5 değerinde 30 mM sodyum asetat tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerindeki karışım için enzimatik proses karıştırıcılı termomikser kullanılarak 45°C’de 1.000 rpm karıştırma hızında 150 dakika sürdürülmüştür.

Pepsin ile hazırlanan fındık proteini izolatu hidrolizatı için, enzim:protein oranı 1:100 olacak şekilde, saf suyun 1 N HCl ile pH 2,0 değerine getirilmesiyle elde edilen tampon çözeltisi içerisinde karışım hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerindeki karışım

için enzimatik proses karıştırıcılı termomikser kullanılarak 37°C’de 1.000 rpm karıştırma hızında 18 saat sürdürülmüştür.

Enzimatik prosesi takiben mikrosantrifüj tüplerindeki enzim içeren karışım önce 95°C’deki su banyosunda 10 dakika ve hemen ardından buz içerisinde soğuyana kadar bekletilmiştir. Böylece, enzimatik tepkime durdurulmuştur. Oda sıcaklığına gelen hidrolizatlar falkon tüplere aktararak 25°C’de 5.000xg’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve çözünmeyen parçacıklar uzaklaştırılmıştır. Son olarak, tüplerden toplanan süpernatant 0,45 µm gözenek çaplı PVDF şırınga filtrelerinden geçirilmiştir (Gülseren ve Corredig, 2013). Hidrolizatlar çalışmada kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

3.2.4. TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi

Proteolitik hidroliz veya simüle edilmiş sindirim işlemlerinin her aşamasında proteinlerin hidroliz derecesi (%DH), Adler-Nissen (1979) tarafından açıklanan TNBS renk ölçüm yöntemi kullanılarak numunedeki serbest amino gruplarının miktarı ölçülerek belirlenmiştir. 400 µl hidrolizat örnekleri, 400 µl %0,44 SDS ve 190 µl 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH: 8,2) ile karıştırılarak içerisine 300 µl %0,1 TNBS solüsyonu ilave edilmiştir. Tepkime karanlıkta ve 50°C’de 60 dakika sürdürülmüştür. 1.000 µl 0,1 M HCl eklenerek tepkime durdurulmuştur. Örnekler oda sıcaklığına gelince spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Numunedeki (h_{tot}) toplam amino grubu sayısı, numunedeki peptit bağlarının tamamen hidrolize edilmesi ile hesaplanmıştır. 1 g fındık proteini izolatu 10 ml 6 N HCl ile karıştırılarak 120°C’de 24 saat süreyle hidroliz edilmiştir. Ardından kaba filtreden süzülerek 100 ml su ile seyreltilmiştir. L-Lösin standardı için 0,01-2 mM konsantrasyonlarında hazırlanıp kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

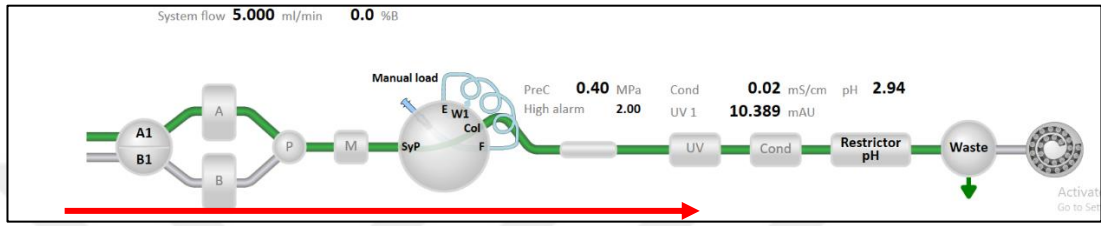
Formülde; h, parçalanmış peptit bağlarının sayısını ve h_{tot} , toplam peptit bağı sayısını ifade etmektedir.

Hesaplama şu şekilde yapılmıştır:

$$\%DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması

Hidrolizatları peptitlerin farklı özelliklerine göre gruplandırmak için FPLC (ÄKTA pure 25 L, GE Healthcare Life Sciences, İsveç) sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan FPLC sisteminin akış yolu Şekil 3.5 üzerinde gösterilmiştir. FPLC sistemini oluşturan temel kısımlar: giriş valfleri, sistem pompaları, basınç monitörü, mikser, enjeksiyon valfi, kolon valfi, UV monitörü, iletkenlik monitörü, pH metre dedektörü, çıkış valfi olarak sayılabilir.

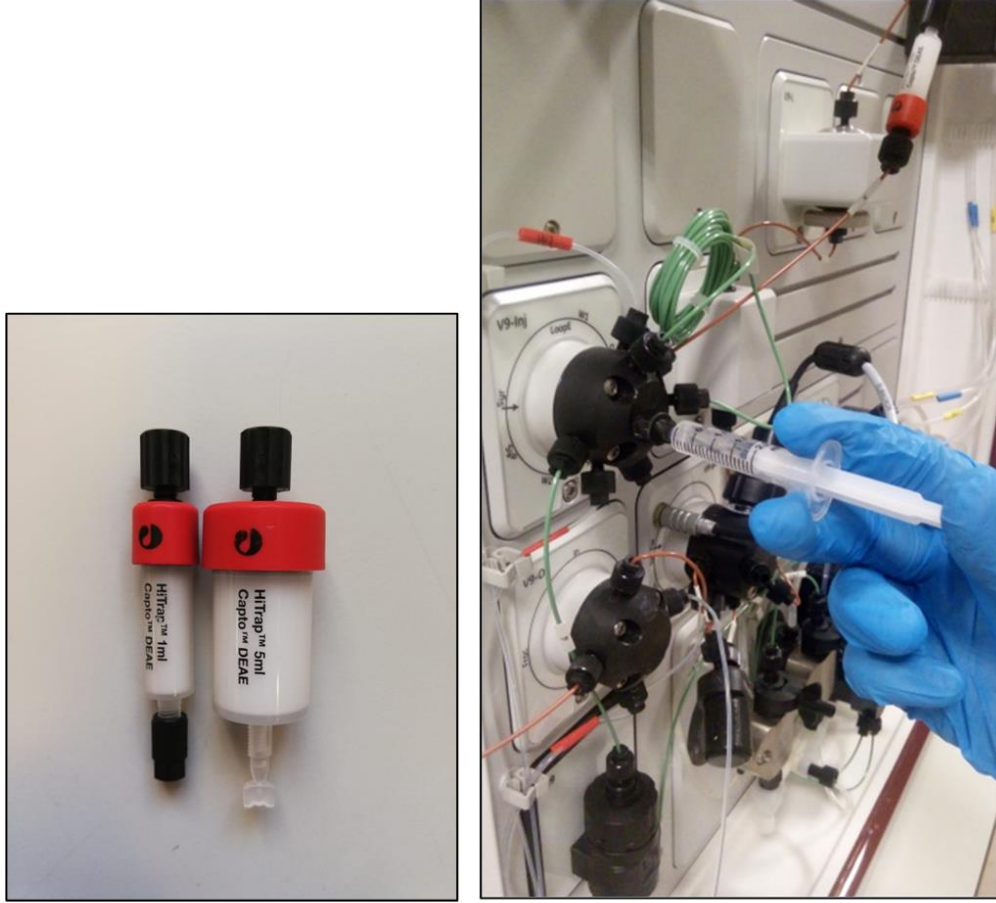


Şekil 3.5: FPLC sistemi akış yolu

Papain, bromelain ve pepsin ile proteolitik hidroliz sonucu oluşan fındık proteini izolatının hidrolizatları ile FPLC sistemine ait farklı özellikteki 1 ml hacimli kolonlarla denemeler yapılmıştır. Hidrofobik kolonlarda etkileşim görülmediği için genelde iyon değiştirici kolonlar ile çalışılmıştır. Kolonlardan HiTrap Capto DEAE (1 ml, zayıf anyonik, GE Healthcare Life Sciences, İsveç), HiTrap Capto Q (1 ml, güçlü anyonik, GE Healthcare Life Sciences, İsveç), HiTrap Capto S (1 ml, güçlü katyonik, GE Healthcare Life Sciences, İsveç), HiTrap DEAE FF (1 ml, zayıf anyonik GE Healthcare Life Sciences, İsveç) anyon değişim kolonları kullanılmıştır. Bu denemelerde uygun metot kurularak kullanılan tampon çözeltinin pH değeri, kullanılan tampon çözeltinin tuz konsantrasyonu, CV (“column volume”, kolon hacmi) gibi parametreler değiştirilerek diğerlerine göre en yüksek absorbans değerinde ayırım sağlayan kolon tercih edilmiştir. Uygun tuz konsantrasyonu belirlemek için 0,5 M, 0,6 M, 0,8 M ve 1 M NaCl içeren farklı tampon çözeltiler ile ön denemeler yapılmıştır.

Fraksiyonlarda daha yüksek sinyal görmek ve hacmen daha fazla örnek ile çalışmak için 1 ml’lik kolondan 5 ml’lik kolona geçiş yapılmıştır (Şekil 3.6).

5 ml'lik kolon için örnek hacmi 10 ml, 20 ml, 30 ml olarak denenmiş ve diğerlerine göre en yüksek absorbans değerinde fraksiyonlarda ayırım sağlayan 20 ml hacminde yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.6: FPLC sistemine ait 1 ml'lik, 5 ml'lik kolonlar ve hidrolizat numunelerinin sisteme enjekte edilmesi (İZÜ Gıda Ar-Ge Laboratuvarı, İstanbul)

Farklı parametrelerdeki denemeler sonunda üç enzimin hidrolizatı için de aşağıda belirtilen parametreler seçilmiştir:

Kolon: HiTrap Capto DEAE (5 ml, zayıf anyonik, GE Healthcare Life Sciences, İsveç)
anyon değişim kolonu

Numune tamponu: 20 mM Tris-HCl pH: 8,0

Elüsyon tamponu: 20 mM Tris-HCl + 0,8 M NaCl pH: 8,0

0-100 lineer gradient akış uygulanarak akışın 25 CV boyunca fraksiyonlarda toplanmasına karar verilmiştir. Her fraksiyon 3 CV olarak toplanmıştır.

FPLC sisteminde fındık proteini izolatının hidrolizatları için kurulan metot Şekil 3.7 üzerinde gösterilmiştir. FPLC sisteminde uygun metot ayarlamaları seçildikten sonra ilk olarak dengeleme aşaması ile kolon mobil faz ile dengelenir. Bu aşamayı, numunenin sisteme girişini sağlayan örnek uygulama aşaması takip eder. Elüsyon tamponu ile fraksiyonların toplandığı aşamadan önce ve sonrasında kolon yıkama aşamaları vardır. İlk kolon yıkama kolondaki bağlanmayan yapıların kolondan çıkması, ikinci kolon yıkamada kolondaki bağlanan ve bağlanmayan tüm yapıların çıkması amaçlanır. Fraksiyonları toplama aşaması otomatik fraksiyon toplayıcı (F9-R, GE Healthcare Life Sciences, İsveç) aracılığıyla elüsyon aşamasında lineer gradient akışın tuz konsantrasyonunun %100 olana kadar 25 CV olacak şekilde devam etmesiyle sıralı olarak toplanır.

The screenshot displays the FPLC software interface for method settings. On the left, a sidebar contains buttons for 'Method Settings', 'Equilibration', 'Sample Application', 'Column Wash', 'Elution', and 'Column Wash'. The 'Elution' button is highlighted. The main window is divided into two tabs: 'Phase Properties' and 'Text Instructions'. The 'Elution' section is active, showing the following settings:

- Flow rate:** 5.000 ml/min [0.000 - 25.000]
- Inlet A:** A1
- Inlet B:** B1
- Elution type:** Gradient elution (selected)
- Start at:** 0.0 % B [0.0 - 100.0]
- Target %B (0-100):** 100.0
- Length (CV):** 25.00
- Fractionation settings:**
 - Fractionation type:** Fixed volume fractionation
 - Fractionation destination:** (empty)
 - Peak fractionation destination:** (empty)
 - Fixed fractionation volume:** 15.00 ml [0.00 - 50.00]
 - Peak fractionation volume:** 2.00 ml [0.00 - 50.00]
- Start fractionation after:** 0.20 CV (only for isocratic elution)

A note at the bottom states: 'Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear'.

Şekil 3.7: FPLC sisteminde fraksiyonlama metodunun kurulması

Tampon çözeltilerin FPLC sistemine verilmeden önce istenilen konsantrasyon ve pH değerinde hazırlanıp, 0,22 µm gözenek çaplı filtreden geçirilip ultrasonikasyon ile hava kabarcıklarının giderilmesi gerekmektedir.

Fraksiyonlama işlemi UV dedektör aracılığıyla 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. Fraksiyonlama esnasında pH değeri, iletkenlik, kolon basıncı ve sistem basıncı takip edilmiştir. Fraksiyonlama sayesinde biyoaktif peptit fraksiyonları belirlenmiş ve sonrasında bu fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 3.8). Toplamda üç farklı enzimle hazırlanan hidrolizatlardan her biri için 2-10 arasındaki 9 fraksiyon ve kolona bağlanamayanları içeren fraksiyon (out) toplanarak (toplam 10 fraksiyon) ile çalışılmıştır. PAF, BRF ve PEF sırasıyla papain, bromelain ve pepsine ait fraksiyonları ifade etmektedir. Toplanan fraksiyonlar çalışmada kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.8: FPLC sisteminde uygun metot ile fraksiyon toplayıcıda fraksiyonların falkon tüplere toplanması

3.2.6. Biyoaktivite testleri

3.2.6.1. ACE önleyici aktivite testi

Peptitlerin *in vitro* ACE önleyici aktiviteleri, hippürik asit oluşumu ile belirlenebilir. Bu yöntemde, Hippüril-His-Leu (HHL) bileşiği substrat olarak kullanılmakta ve ACE aktivitesi ile bu kompleks, hippürik asit ile His-Leu dipeptidine ayrıştırılmaktadır (Sinha vd., 2007). ACE önleyici peptitlerin varlığında, ACE aktivitesinin düşmesi beklenmektedir. Bu yöntem ve literatürdeki birçok yöntem, Cushman ve Cheung (1971) yönteminin değiştirilmesiyle tanımlanmıştır.

ACE'nin aktivite gösterebilmesi için final konsantrasyonunda yaklaşık 400 mM NaCl içermesi gerekir. Bu nedenle önceden 20 mM Tris-HCl tamponunda saflaştırılan peptit fraksiyonlarının tuz konsantrasyonları yaklaşık olarak 0,8 M NaCl içerecek şekilde ayarlanmıştır. Sodyum borat (0,1 M, pH: 8,3) tamponunda hazırlanan 50 µl 6,5 mM HHL ve 90 µl peptit fraksiyonu karıştırılarak 10 dakika 37°C 1.000 rpm karıştırma hızında termomikser içerisinde ön inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemi takiben karışıma 40 µl ACE (25 mU/ml) eklenerek tepkime 1 saat sürdürülmüştür. Süre bitiminde, 1 M HCl (180 µl) karışıma eklenerek tepkime durdurulmuştur.

ACE aktivitesi testi modüler HPLC sistemi (Prominence LC-20A, Shimadzu Corporation, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). HPLC sistemi; degazer (DGU-20A5R), pompa/solvent dağıtıcı modül (LC-20AD), oto örnekleyici (SIL-20A HT), kolon fırını (CTO-10AS VP), UV-VİS dedektör (SPD-20A) ana kısımlarından oluşmaktadır. Bu çalışmada, ODS-3 C18 kolonu (250 x 4,6 mm, por boyutu 110 Å, partikül büyüklüğü 5 µm, Phenomenex, ABD) kullanılarak Sheih, Fang ve Wu (2009) tarafından tarif edilen yöntem uygun değişikliklerle kullanılmıştır.

Örnekler 10 µl doğrudan kolona enjekte edilerek ACE inhibisyonu 228 nm'de takip edilmiştir. Mobil faz olarak %50 metanolde hazırlanmış %0,1 TFA kullanılmıştır. İsookratik akış hızı, 1 ml/dakika olarak ayarlanmıştır. Analiz süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak peptit yerine 20 mM Tris-HCl+0,8 M NaCl tamponu kullanılmıştır. Referans inhibitör olarak Kaptopril inhibitöründen yararlanılmıştır. Kaptopril, Tris-HCl+0,8M NaCl tamponunda 1-1.000 nM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Negatif kontrol değerinde HHL'nin ACE varlığında %100 HA'ya dönüştüğü varsayılmıştır ve hesaplamalar bu varsayıma göre

yapılmıştır. HA'daki azalmanın araştırıldığı fraksiyon örnekleri, kontrol örneği ile kıyaslanarak % inhibisyon aktivitesi değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ ACE inhibisyon aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100 \quad (3.2)$$

Ayrıca hippürik asit standardı 0,1-1.000 nM konsantrasyonlarında hazırlanıp HA kalibrasyon grafiği kullanılarak kantitatif ACE inhibisyonu da hesaplanmıştır.



Şekil 3.9: HPLC sisteminde fraksiyonların ayarlanan metot ile ACE önleyici aktivite testinin çalışılması

3.2.6.2. Antidiyabetik aktivite testleri

3.2.6.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi

Peptit fraksiyonlarının DPP-IV önleyici aktivitelerini belirlemek için Nongonierma vd. (2018) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 50 µl fraksiyon örneklerinden ve 50 µl 0,8 mM substrattan (Gly-Pro-pNA) tüp içerisine alınarak karıştırılmıştır. Bu karışım 37°C'de termomikser içerisinde 1.000 rpm karıştırma hızında 10 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda DPP-IV (0,01 U/ml) enziminden 100 µl karışıma eklenerek tepkime başlatılmıştır.

Tepkimeyi durdurmak için 200 µl 1 M sodyum asetat (pH: 4,0) ilave edilmiştir. Tepkime 1 saat sürdürülmüş ve süre sonunda substrattan salınan pNA miktarı spektrofotometre kullanılarak 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Referans inhibitör olarak Diprotin A'dan (Ile-Pro-Ile) yararlanılmıştır. Bütün reaktifler 100 mM Tris-HCl pH: 8,0 tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. Negatif kontrol benzer bir biçimde sadece substrat ve tampon çözelti ile hazırlanmıştır. Örneklerin % inhibisyon değerleri, negatif kontrol örneği ile karşılaştırılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPP – IV inhibisyon aktivitesi} = \frac{(\text{ABS}_{\text{negatif kontrol}} - \text{ABS}_{\text{örnek}})}{(\text{ABS}_{\text{negatif kontrol}} - \text{ABS}_{\text{blank}})} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.6.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi

Johnson vd. (2011) tarafından bildirilen metot değişiklik yapılarak uygulanmıştır. 50 µl fraksiyon örnekleri 100 µl alfa-amilaz enzimi (2 U/ml) ile 5 dakika 20°C'de ön inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyondan sonra 0,02 M sodyum fosfat tamponunda (pH: 6,9) hazırlanmış %1'lik 100 µl nisaşta (sodyum fosfat tamponu içinde çözündürülmüş ve 15 dakika süreyle kaynatılmış) ilave edilip 15 dakika 20°C'de inkübasyona devam edilmiştir. Uygun tampon çözeltide hazırlanan 100 µl %1'lik DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) ilave edilmiş ve 15 dakika boyunca kaynar durumdaki bir su banyosuna yerleştirilmiştir. Karışıma 350 µl saf su ilave edilerek spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Yüzde inhibisyon, %100 enzim aktivitesine sahip negatif kontrole göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Alfa – amilaz inhibisyon aktivitesi} = \frac{(\text{ABS}_{\text{negatif kontrol}} - \text{ABS}_{\text{örnek}})}{(\text{ABS}_{\text{negatif kontrol}} - \text{ABS}_{\text{blank}})} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.6.2.3. Alfa-glukozidaz önleyici aktivite testi

Fraksiyonların alfa-glukozidaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici aktivitesi, Kim vd. (2005) tarafından önerilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Enzimin aktivitesi (1 U/ml) ve substrat konsantrasyonu (35 mM p-nitrofenil glukopiranozid (pNPG) çözeltisi) ile ilgili küçük değişiklikler yapılmıştır. Substrat solüsyonu p-nitrofenil glukopiranosid, 35 mM metanol çözeltisi içinde hazırlanmıştır. 10 µl enzim (1 U/ml),

10 µL numune, 20 µl substrat ve 500 µL fosfat tamponu karıştırılmış ve 37°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, tepkimeyi sonlandırmak için tepkime karışımına 2 ml 0,1 M Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Karışımların absorbansı spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar, inhibitör olmadan aynı miktarda enzimin aktivitesiyle karşılaştırılmıştır (inhibitör yerine tampon). İnhibisyon etkisi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Alfa – glukosidaz inhibisyon aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100$$

(3.5)

3.2.6.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi

AChE aktivitesinin inhibisyonu, Ellman’ın kolorimetrik yöntemi (Ellman vd., 1961) bazı modifikasyonlarla değiştirilerek belirlenmiştir. 160 µl 1,5 mM DTNB (pH: 8,0 ve 100 mM sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış), 50 µl AChE (0,2 U/ml), 10 µl fraksiyon örnekleri karıştırılarak 25°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. 30 µl asetilkolin iyodid (15 mM) ilavesiyle ilk 30 saniye spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. % İnhibisyon, enzim aktivitesini düşürmeyen (%100) negatif kontrol örneğine kıyasla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ AChE önleyici aktivite} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100$$

(3.6)

3.2.6.4. Antioksidatif aktivite testleri

3.2.6.4.1. DPPH yöntemi

Fraksiyonlama işlemleri tamamlanan peptit numuneleri (1 ml), metanolde 1 mM hazırlanan 1 ml DPPH ile karıştırılmıştır ve numunelerde zamana bağlı olarak spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır (517 nm). Absorbans değeri sabitlenene kadar tepkime devam ettirilmiştir (Memarpoor-Yazdi, Asoodeh ve Chamani, 2012). Bu testte, troloks ve BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\% \text{ DPPH süpürme aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100$$

(3.7)

3.2.6.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi

Bu testte peptitlerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasitesi Ebrahimzadeh, Nabavi ve Nabavi (2009) yöntemine uygun olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki 0,5 ml peptit çözeltisi, 1,6 ml saf su ve 0,05 ml 2 mM $FeCl_2$ karıştırılmıştır. 30 saniye sonra bu karışıma 0,1 ml 5 mM ferrozin eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin absorbansı spektrofotometrede ölçülmüştür (562 nm). Bu testte, EDTA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin şelatlama kapasitesi % cinsinden EDTA ile karşılaştırılmıştır.

$$\% \text{ Demir şelasyon aktivitesi} = \frac{(ABS_{\text{negatif kontrol}} - ABS_{\text{örnek}})}{(ABS_{\text{negatif kontrol}} - ABS_{\text{blank}})} \times 100 \quad (3.8)$$

3.2.6.4.3. FRAP yöntemi

Fe^{3+} , Fe^{2+} iyonlarına indirgeme yeteneği, Zhang, Wang ve Xu (2008) tarafından detaylandırılan yöntemle göre gerekli değişiklikler yapılarak ölçülmüştür.

500 µl fraksiyon örnekleri ile %1 (w/v) potasyum ferrisiyanit (500 µl) karıştırılarak su banyosunda 50°C'de 30 dakika süreyle ısıtılmıştır. Ardından %10 (w/v) TCA (500 µl) ilave edilmiş ve 1.650xg değerinde 10 dakika santrifüjlenmiştir. Kalan sıvı karışımın üzerine %0,1 (w/v) demir klorür çözeltisi (200 µl) ilave edilerek spektrofotometrede ilk 5 dakika 700 nm dalga boyunda ölçüm takip edilmiştir. Bu testte, troloks ve BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\% \text{ Demir(III) iyonu indirgeyici kapasite} = \frac{(ABS_{\text{negatif kontrol}} - ABS_{\text{örnek}})}{(ABS_{\text{negatif kontrol}} - ABS_{\text{blank}})} \times 100 \quad (3.9)$$

3.2.6.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Bu çalışma Halliwell, Gutteridge ve Aruoma (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntemle uygun olarak yapılmıştır. 0,1 ml 10 mM $FeSO_4$, 0,1 ml 10 mM EDTA, 0,5 ml 10 mM α -deoksiriboz, 0,9 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH: 7,4), 0,2 ml peptit çözeltisi karıştırılmıştır. Bu karışıma 0,2 ml 10 mM H_2O_2 eklenerek 37°C'de numuneler 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu işlemin hemen ardından 1 ml %2,8

TCA ve 1 ml %1 TBA numune tüplerine katılarak tüpler 15 dakika boyunca kaynayan bir su banyosunda tutulmuştur. Numune sıcaklığı oda sıcaklığına gelince absorbans değerleri 532 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak peptit çözeltisi yerine tampon çözelti kullanılmıştır. BHT ve troloks bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % hidroksil radikali tutma kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidroksil radikali tutma aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100 \quad (3.10)$$

3.2.6.4.5. ABTS yöntemi

ABTS yöntemi, ABTS radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanır.

ABTS yöntemi, Re vd. (1999) çalışmasına göre yapılmıştır. Final konsantrasyonu 7 mM ABTS ve 2,45 mM potasyum persülfat olacak şekilde stok solüsyon suda hazırlanmış ve 16 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Analizler için stok solüsyon absorbansı 734 nm dalga boyunda $0,7 \pm 0,02$ olana kadar 100 mM potasyum fosfat tamponu pH: 7,4 ile seyreltilmiştir. 200 µl örnek, 2 ml ABTS solüsyonuyla karıştırılmış ve ilk 10 dakika oda sıcaklığında spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Bu testte, troloks ve BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin % ABTS süpürme kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ABTS süpürme aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100 \quad (3.11)$$

3.2.6.4.6. Süperoksit anyon tutma aktivitesi testi

Bu testte pirogallolün bazik koşullarda süperoksit anyonu oluşturması ve otoksidasyonun hızlanması tepkimelerine peptitlerin etkisi incelenmiştir (Marklund ve Marklund, 1974). Farklı konsantrasyonlardaki 0,2 ml peptit çözeltisi ve 1,8 ml 50 mM tampon çözelti (pH: 8,2) karıştırılmıştır (25°C, 20 dakika). Bu işlemten sonra, karışıma 40 µL 45 mM pirogallol (10 mM HCl'de hazırlanmış) eklenmiştir. İlk 5 dakika içinde oda sıcaklığında spektrofotometrede 320 nm dalga boyunda absorbans

değeri ölçülmüştür. Bu testte, troloks ve BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Numunelerin otoksidasyonu önleme kapasitesi % cinsinden bu bileşiklerle karşılaştırılmıştır.

$$\% \text{ Süperoksit anyon tutma aktivitesi} = \frac{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSörnek})}{(\text{ABSnegatif kontrol} - \text{ABSblank})} \times 100$$

(3.12)

3.2.7. Peptitlerin tanımlanması

3.2.7.1. LC-Q-TOF/MS analizi

MS analizleri, Acıbadem Üniversitesi Labmed'de gerçekleştirilmiştir (hizmet alımı) ve TÜBİTAK 1001 Programı'ndan (proje no:217O063) sağlanan destek ile finanse edilmiştir.

a) Örnek hazırlığı

Farklı enzimler ile (papain, bromelain, pepsin) ile hidroliz edilmiş fındık proteini izolatına ait fraksiyonlar, önce 10 mM DTT ile 55°C'de 10 dakika inkübe edilerek peptitler redükte edilmiştir. Ardından peptit karışımı oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 20 mM iyodoasetamid ile alkile edilmiştir. Örnekler 30 kDa filtrelerden geçirilmiştir. Örnekler üzerinde peptit konsanstrasyon tayini yapılmış ve örnekler enjeksiyon başına 1 µg olacak şekilde LC-Q-TOF/MS analizi için viallere alınmıştır.

b) LC-Q-TOF/MS analizi

Analiz öncesi, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS QToF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapılmıştır. Metot SONAR ve hassasiyet (sensitivite) moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda asetonyitril gradiendi ile fraksiyonlanmıştır. Asetonyitril %5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlanmış ve elektrosprey iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmiştir. Analiz esnasında, m/z 50-1.950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplanmıştır. 0,7 saniye kadar MS analizi gerçekleştirilmiş ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır. Ardından 0,7 saniye kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve amino asit dizisi (sekans) bilgisinin elde edilmesi sağlanmıştır.

Protein tanımlamaları yapılırken her bir örnek için uygun protein data bankları kullanılmıştır.

c) Veri analizi

ProteinLynx Global Server (PLGS 3.0) yazılımı kullanarak peptit ve protein tanımlamaları yapılmıştır. Her örnek türü için uygun data bank kullanılarak analiz edilmiştir. “False positive rate” %1 olarak ayarlanmıştır. PLGS için seçilmiş parametreler aşağıda sıralanmıştır:

Peptit toleransı ve fragment toleransı: otomatik

Her peptit için minimum fragment iyon eşleşmesi: 2

Her protein için minimum iyon eşleşmesi: 5

Her protein için minimum peptit eşleşmesi: 1

Maksimum protein kütlesi: 250.000

Primer enzim: papain, bromelain ve pepsin

Missed cleavages: 1

Fixed modification: Carbamidomethyl C

Variable modifications: Acetyl N-TERM, Deamidation N, Q, Oxidation M

Lock mass for charge 1: 785,8426 Da/e

Lock mass window: 0,25 Da

Low energy threshold: 60 counts

High energy threshold: 10 counts

3.2.7.2. In silico analizler

LC-Q-TOF/MS analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karşılaştırmalar yapılarak numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Buna ek olarak, literatürde tarif edilen bir dizi *in silico* analiz tekniği

kullanılarak peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi işlemleri tamamlanmıştır. Buna göre, analizde kullanılan *in silico* yöntemler aşağıda sıralanmaktadır.

Uygun tekniklerle dizilimleri belirlenen peptitlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi literatürde bulunan *in silico* yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.

Öncelikle, peptitlerin izoelektrik noktası ve toksisite parametreleri Gupta vd. (2013) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.

Peptit dizilimlerinin biyoaktif olma ihtimali (Peptide Ranker değeri), biyoaktivite çeşidinden bağımsız olarak Mooney vd. (2012) çalışmasına uygun olarak hesap edilmiştir.

Aktif fraksiyonların ilgili aktiviteyi spesifik olarak ortaya çıkarma potansiyeli ve ilgili inhibisyon parametreleri Minkiewicz vd. (2008b) çalışmasına uygun olarak belirlenmiştir.

Son olarak, biyoaktivitenin gözlemlendiği ve *in silico* bulgularla bu gözlemlerin desteklendiği durumlarda, ilgili peptitlerin ve inhibe ettikleri enzimlerin arasındaki etkileşimler Trabuco vd. (2012) tarafından öngörüldüğü biçimde belirlenmiş ve ilgili çizimler hazırlanmıştır.

3.2.8. Gıda uygulamaları ve ürün analizleri (FİSKOBİRLİK tesisleri)

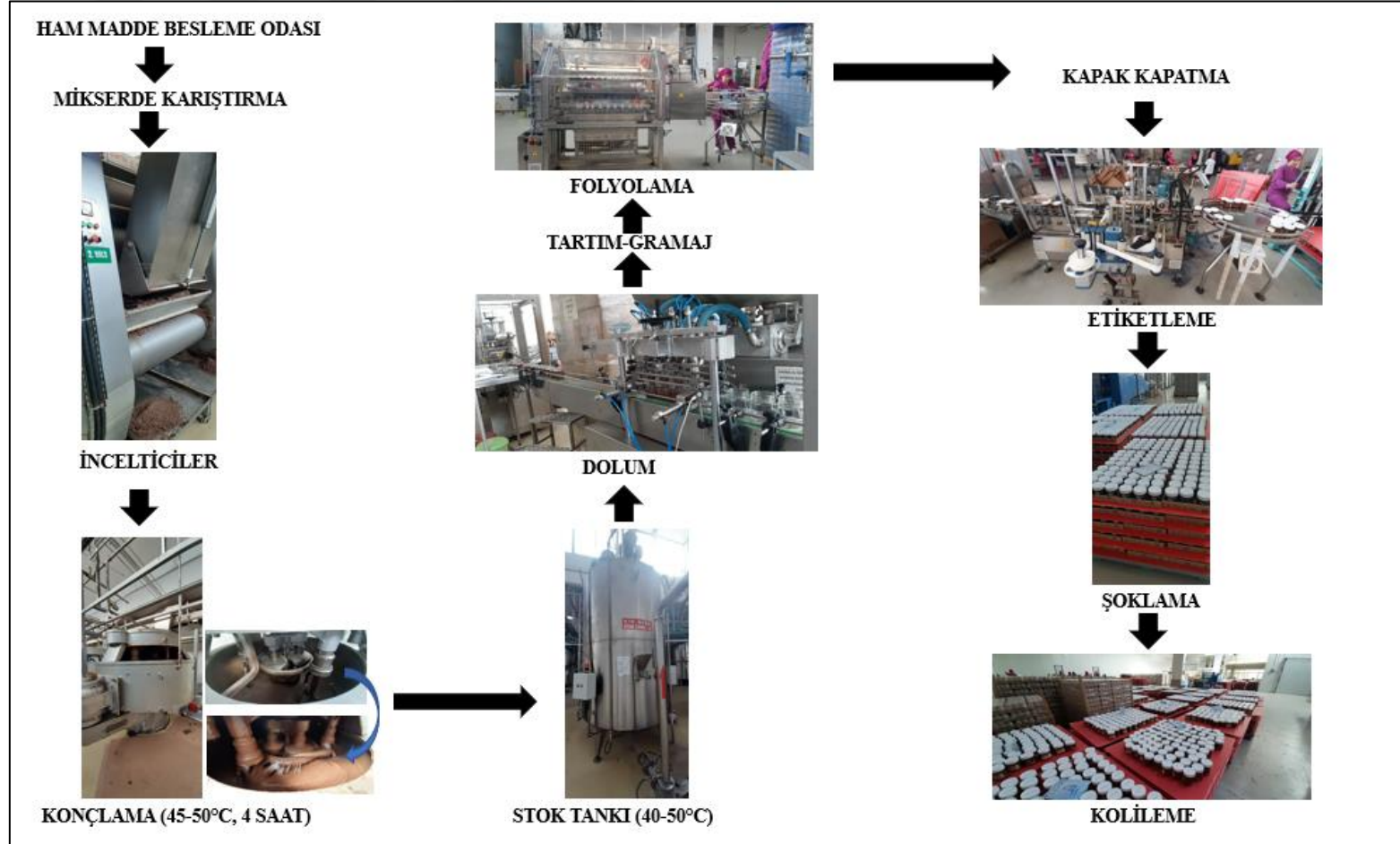
Üç farklı enzim ile üretilen hidrolizatlara ait 3 farklı fraksiyon (PAF4, BRF10, PEF6) ve posadan elde edilen fındık proteini izolatu, yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle FİSKOBİRLİK'e ürün denemesinde kullanılmak üzere götürülmüştür (Şekil 3.10). Proje kapsamında yürütülen çalışmada üretilen biyoaktif peptit fraksiyonları, firma prosedürlerine uygun olarak ürünlerde kullanılmıştır. Peptit fraksiyonlarının, kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Eklenen peptit fraksiyonlarının ürün özelliklerine etkisini incelemek amacıyla yine firma prosedürlerine uygun olarak duyu, kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.



Şekil 3.10: FİSKOBİRLİK tesislerinde değerlendirilen örneklerin liyofilize edilmesi (İZÜ Gıda Ar-Ge Laboratuvarı, İstanbul)

3.2.8.1. Kakaolu fındık kreması üretimi

Fabrika prosesindeki kakaolu fındık kreması üretim akım şeması Şekil 3.11’de verilmiştir. Bu prosedürlere uygun şekilde ürünler düşük gramajlarda hazırlanmıştır.



Şekil 3.11: Kakaolu fındık kreması üretim akış şeması (FİSKOBİRLİK Üretim Tesisi, Giresun)

Toplamda %16 fındık içeren 200 gram üretilen örnek için belirlenen reçete:

- 181,3 g flake (toz karışım: kakao, peynir altı suyu tozu, süt tozu, laktoz, toz şeker, 40 mikrondan küçük tanecik içeren fındık püresi)
- 8,7 g katı yağ (IFFCO: palm yağı)
- 10 g sıvı yağ (ayçiçek yağı)
- 0,83 g lesitin
- 0,05 g aroma

Şekil 3.12’de manuel yapılan konçlamanın farklı aşamalarındaki ürünün fiziksel yapısının değişimi görülmektedir.

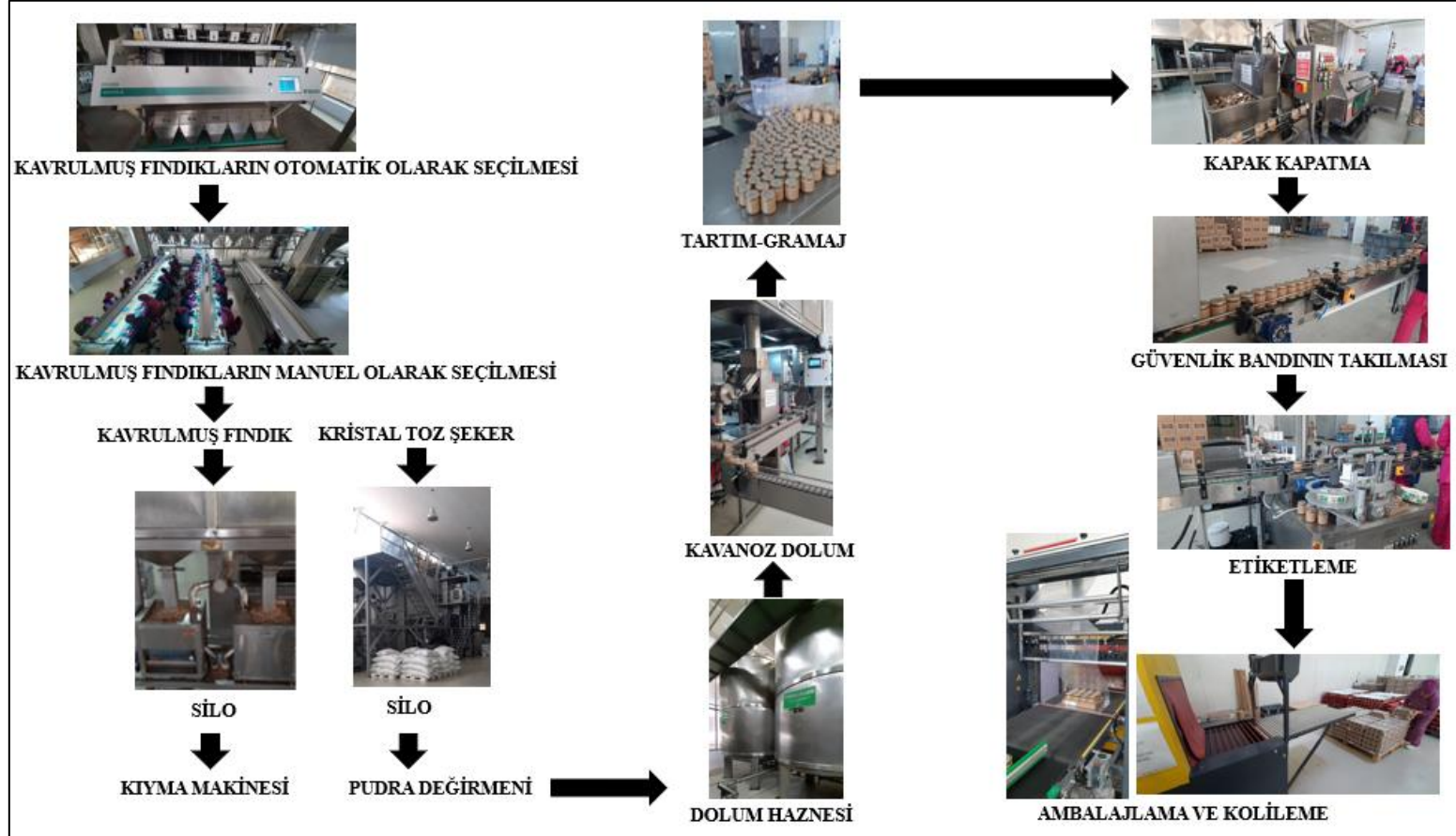


Şekil 3.12: Manuel konçlama esnasında ürünün fiziksel ve tekstürel değişimi (FİSKOBİRLİK Kalite Kontrol Laboratuvarı, Giresun)

Üretilen ürünlerde fındık proteini izolatu %0,25, %0,5, %1; PAF4 %0,25, %0,5, %1; BRF10 %0,25, %0,5, %1, %2; PEF6 %0,25, %0,5, %1 konsantrasyonlarında ürüne konçlama öncesinde ilave edilmiştir.

3.2.8.2. Fındık ezmesi üretimi

Fabrika prosesindeki fındık ezmesi üretim akım şeması Şekil 3.13’te verilmiştir. Bu prosedürlere uygun şekilde ürünler düşük gramajlarda hazırlanmıştır.



Şekil 3.13: Fındık ezmesi üretim akış şeması (FİSKOBİRLİK Üretim Tesisi, Giresun)

200 gram üretilen örnek için belirlenen reçete %70 fındık ve %30 şekerden oluşmaktadır.

Üretilen ürünlerde fındık proteini izolatu %0,25, %0,5, %1, %2; PAF4 %0,25, %0,5, %1; BRF10 %0,25, %0,5, %1, %2; PEF6 %0,25, %0,5, %1 konsantrasyonlarında ürüne karıştırma öncesinde ilave edilmiştir.

3.2.8.3. Ürünlerin fabrika analizleri

Duyusal analizler

Renk, koku ve tat analizleri yapılmıştır. Renk analizi, sadece ham madde olan çiğ ve kavrulmuş fındığa yapılmıştır.

Kimyasal analizler

Nem analizi hızlı nem tayin cihazı (HB43 Halogen, Mettler Toledo, İsveç) ile yapılmıştır.

Asit analizi, TS EN ISO 660 (2020) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Sonuçlar 100 g yağda oleik asit cinsinden bulunmuştur.

Peroksit analizi, TS EN ISO 3960 (2017) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Peroksit değeri, oksijenin hayvansal veya bitkisel yağlara kimyasal olarak bağlanan miktarının ölçümüdür.

Yağ tayini, ürünlerin pres ile yağının çıkartılarak Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazında çalışılmasıyla yapılmıştır. Şekil 3.14 üzerinde yağ çıkarmak için pres sistemi ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı gösterilmiştir.

Aflatoksin analizi, HPLC Metodu ile AOAC (2000), 999.07'ye uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.15). Laboratuvara gelen örnekler su ile 1/1 oranında karıştırılarak blender içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler akredite metoda uygun olarak immünoafinite kolondan geçirilmiş ve HPLC sisteminde kolon sonrası türevlendirme ile miktar tayini yapılmıştır (minimum tespit edilebilir seviye: B1> 0,04 ng/g, toplam > 0,1 ng/g).



Şekil 3.14: Pres aleti ve Gerhart Soxhlet yağ tayin cihazı (FİSKOBİRLİK Kalite Kontrol Laboratuvarı, Giresun)



Şekil 3.15: Aflatoksin analizinde kullanılan HPLC sistemi (FİSKOBİRLİK Kalite Kontrol Laboratuvarı, Giresun)

Mikrobiyolojik analizler

Çalışmalarda kullanılan temel ham madde olan fındığa yapılan bir dizi mikrobiyolojik analiz bulunmaktadır. Bu analizler Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde yer alan parametrelere göre incelenmiştir (TGK, 2011). Bu bağlamda kullanılan besiyeri ortamları şöyle sıralanabilir:

Toplam bakteri (PCA, 35°C, 48 saat inkübasyon)

Maya-küf (YGC Agar, 25°C, 5-7 gün inkübasyon)

Koliform (Compact Dry EC, 35±2°C, 24 saat inkübasyon)

Escherichia coli (Compact Dry EC, 35±2°C, 24 saat inkübasyon)

Staphylococcus aureus (Compact Dry SA, 35±2°C, 24±2 saat inkübasyon)

Salmonella 25g. Da (Compact Dry SL, 35±2°C, 24±2 saat inkübasyon)

3.2.8.4. Ürünlerin alerjenite testleri

Alerjenite analizleri, LTS Laboratuvar Hizmetleri'nde gerçekleştirilmiştir (hizmet alımı) ve TÜBİTAK 1001 Programı'ndan (proje no:217O063) sağlanan destek ile finanse edilmiştir. Bu analizler, söz konusu akredite laboratuvarın prosedürlerine uygun olarak ticari ELISA kiti olan Ridascreen® Fast Hazelnut (R-Biopharm, Almanya) ile yapılmıştır. Örnekler, yoğun fındık içeriğine sahip olduğundan gerekli hâllerde numuneler seyreltilerek ölçüm yapılmıştır.

3.2.8.5. Ürünlerin simüle edilmiş gastrointestinal sindirim testleri

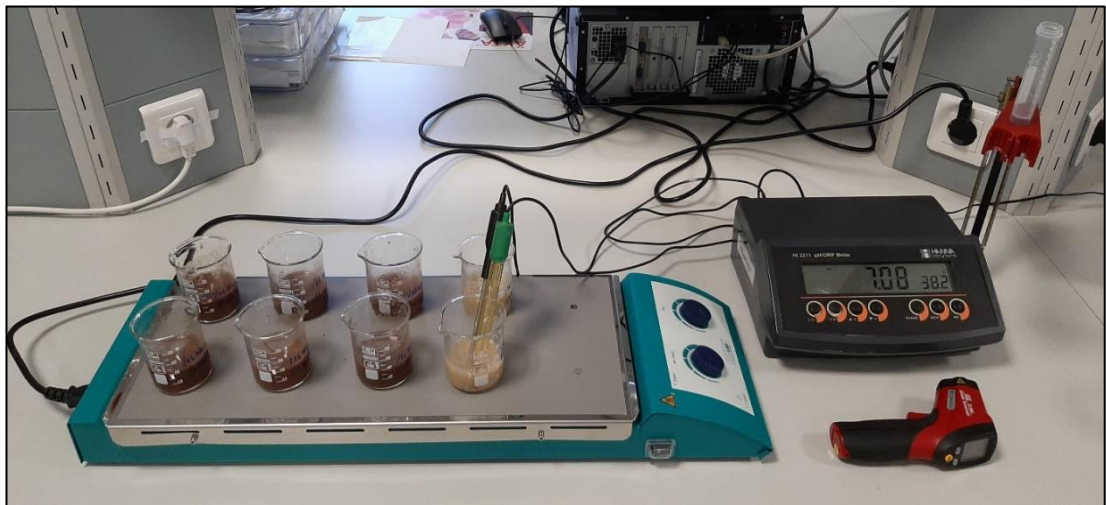
Biyoaktif peptitler gıda uygulamalarında kullanıldıktan sonra, bu ürünlerde görülecek olan biyoaktivitenin değerlendirilmesi amacıyla simüle edilmiş (*in vitro*) gastrointestinal sindirim testleri yapılmıştır (Şekil 3.16). Gıda matrisinden kaynaklanan etkileri görmek için aynı konsantrasyonlarda (%1) ilave bileşen içeren su karışımı da her bileşen için analize eklenmiştir. Öncelikle numuneler kısa bir oral aşamadan geçirildikten sonra mide ortamını simüle etmek amacıyla sıcaklık (37°C) ve pH kontrolü yapılarak ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda simüle edilmiş gastrik sıvı ortamına ("simulated gastric fluid", SGF) tabi tutulmuştur. Buna ek olarak, bu

aşamadan alınan numuneler simüle edilmiş bağırsak sıvısı (“simulated intestinal fluid”, SIF) ortamında değerlendirilmiştir. Bu incelemeler güncel bir uluslararası standart olan INFOGEST tavsiyeleri göz önüne alınarak yapılmıştır (Minekus vd., 2014). Detaylar aşağıda verilmektedir:

Ağız aşaması: 5 gram numune ile 3,5 ml simüle edilmiş tükürük sıvısı (“simulated salivary fluid”, SSF) karıştırılmış ve karışım blender ile homojen hâle getirilmiştir. SSF çözeltisinde hazırlanan alfa-amilaz çözeltisi (0,5 ml, 290 U/ml) karışıma eklenmiştir. Bu karışıma son olarak 25 µl 0,3 M CaCl_2 ve 975 µl saf su eklenmiş ve karışım tekrar 10 dakika süre ile karıştırılmıştır.

Mide aşaması: 10 ml sıvı numune ya da oral sıvı 7,5 ml SGF ile karıştırılmıştır. Bu karışıma 1,6 ml pepsin stok çözeltisi (25.000 U/mg), 5 µl 0,3 M CaCl_2 , 0,2 ml 1 M HCl (pH değerini 3’e düşürmek için) ve 695 µl saf su eklenmiştir. pH: 3,0 olarak ayarlanmış ve karıştırma işlemi 2 saat sürmüştür.

Bağırsak aşaması: 20 ml gastrik karışıma 11 ml SIF çözeltisi eklenmiştir. Tripsin aktivitesi 800 U/ml olan ve SIF çözeltisinde hazırlanmış pankreatin de bu karışıma eklenmiştir. 2,5 ml 160 mM taze hazırlanmış safra, 40 µl 0,3 M CaCl_2 ve 0,15 ml 1 M NaOH bu karışıma katılmış ve pH değerinin 7,0 olması hedeflenmiştir. Son olarak 1,31 ml saf su katılarak karışım tamamlanmıştır. pH: 7,0 olarak ayarlanmış ve karıştırma işlemi 2 saat sürmüştür. İşlem sonunda örnekler 100°C’de 15 dakika bekletilerek enzimatik tepkime inaktive edilmiştir.



Şekil 3.16: Ürünlerin sindirim testlerinin yapılması

Sindirilmiş örnekler analizlerde kullanılmak üzere, önce kaba filtre kâğıdından geçirilerek (Şekil 3.17) sonra +4°C’de 4.000xg’de 30 dakika santrifüj edilerek katı kısımlarından ayrılmıştır. Sıvı örnekler 0,22 µm gözenek çaplı CA şırınga filtreden geçirilerek analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.17: Sindirilmiş ürünlerin kaba filtreden geçirilmesi



Şekil 3.18: Ürünlerin sindirim öncesi ve sindirim sonrası görünümü

3.2.8.6. Ürünlerin biyoaktivite testleri

Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 peptit fraksiyonları içeren ürünlere biyoaktivite testleri uygulanarak biyoaktif peptitlerin üretim proseslerinde ve simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sürecinde biyoaktif özelliklerinin değişimi incelenmiştir. Bu yöntemlerin uygulanması esnasında, ACE önleyici aktivite testi (Bölüm 3.2.6.1) ile birlikte DPP-IV önleyici aktivite testleri (Bölüm 3.2.6.2.1, 3.2.6.2.2, 3.2.6.2.3) ve antioksidatif aktivite testleri (Bölüm 3.2.6.4.1, 3.2.6.4.2, 3.2.6.4.3, 3.2.6.4.4, 3.2.6.4.6) önceki bölümlerde tarif edildiği şekliyle uygulanmıştır.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Çalışmada yürütölen tüm analizler en az iki paralel ve iki tekerrürlü olarak yapılmıştır. Analiz sonuçları, gereğinde varyans ve regresyon analizleri ($p<0,05$ önem düzeyi) üzerinden değerlendirilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Fındık proteinlerinin parçalanması ile elde edilen biyoaktif peptitlerin belirlenmesi amacıyla TÜBİTAK 1001 Programı 217O063 numaralı proje kapsamında yürütülen çalışmada elde edilen sonuçlar bu bölümde verilmiştir.

4.1. Fındık posasının kompozisyon analizi

Çalışmada kullanılan fındık posasının protein, nem ve kül analiz sonuçları Tablo 4.1.1’de verilmiştir. Bu posadan elde edilen fındık proteini izolatına ait sonuçlar da bu tabloda yer almaktadır. Fındık posası $8,94 \pm 0,1$ nem, $6,42 \pm 1,4$ kül ve $50,02 \pm 0,4$ protein içeriğine sahiptir. Çalışmada elde edilen fındık posasına ait veriler, fındık posasına ait TS 323 (2003) tarafından belirlenen standart değerlere uygundur. Bu veriler içerisinde % nem en fazla 12, % protein en az 41 ve % kül en fazla 9 olarak belirlenmiştir. Fındık proteini izolatı $3,44 \pm 0,3$ nem, $1,18 \pm 2,4$ kül ve $94,81 \pm 2,9$ protein içeriğine sahiptir.

Tablo 4.1.1: Fındık posası ve fındık proteini izolatı için nem, kül, protein yüzdeleri

Analiz adı	Fındık posası	Fındık proteini izolatı
Nem (%)	$8,94 \pm 0,1$	$3,44 \pm 0,3$
Kül (%)	$6,42 \pm 1,4$	$1,18 \pm 2,4$
Protein (%)	$50,02 \pm 0,4$	$94,81 \pm 2,9$

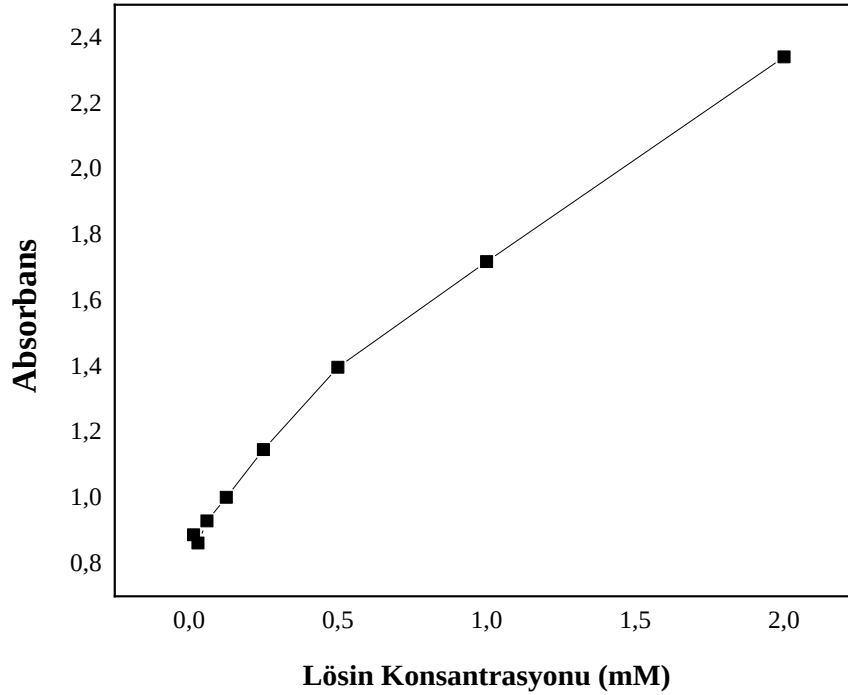
4.2. TNBS yöntemi ile hidroliz derecesinin belirlenmesi

Papain, bromelain, pepsin kullanılarak hazırlanan hidrolizatların hidroliz derecesi (%DH), Adler-Nissen (1979) tarafından tarif edilen TNBS renk ölçüm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde numunedeki serbest amino gruplarının miktarı renk değişimlerine bağlı olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).



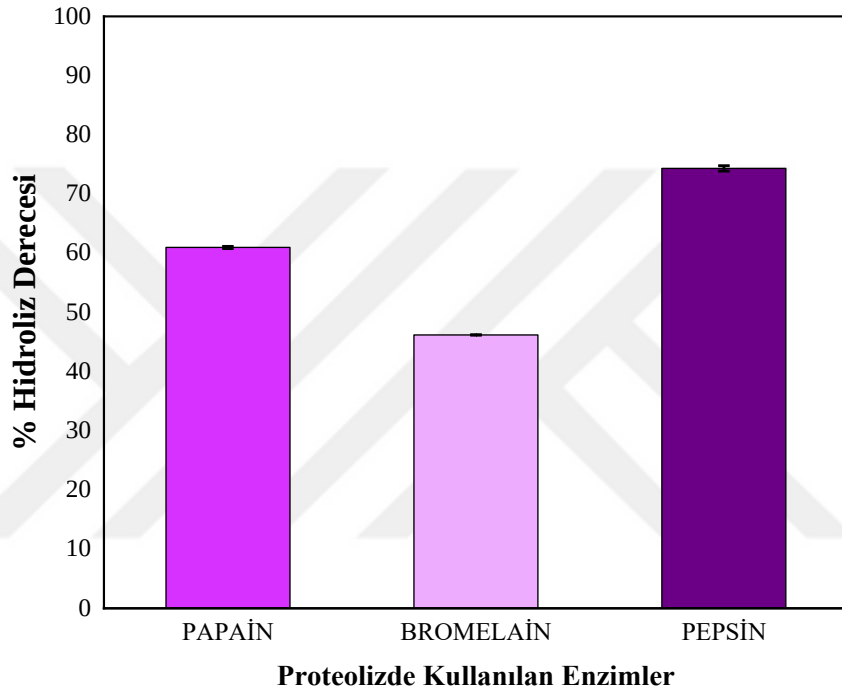
Şekil 4.1: Farklı hidrolizatlarda TNBS yöntemi ile %DH değerlerinin değişimi. Ok yönünde %DH değerleri düşmektedir.

Numunedeki toplam amino grubu sayısı (h_{tot}), fındık proteini izolatındaki peptit bağlarının tamamen hidroliz edilmesi ile hesaplanmıştır. L-Lösin standardı 0,01-2 mM konsantrasyonlarında hazırlanıp kalibrasyon grafiği kullanılarak toplam amino asit sayısı (h_{tot} ve h), lösin amino eş değeri cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: L-Lösin standardı kalibrasyon grafiği (standart sapma $\leq 3\%$)

Papain, bromelain, pepsin kullanılarak hazırlanan hidrolizatlara ait sonuçlar Şekil 4.3 üzerinde verilmiştir. Çalışmada kullanılan enzimatik muamelelerden, papain $60,97 \pm 0,2$, bromelain $46,18 \pm 0,1$, pepsin $74,33 \pm 0,4$ hidroliz derecesine sebep olmuştur. Papain, bromelain ve pepsin hidrolizatlarının değerleri karşılaştırıldığında pepsin enziminin diğerlerine kıyasla fındık proteini izolatını daha yoğun biçimde hidrolize uğrattığı görülmektedir.



Şekil 4.3: Enzimlerin fındık proteini izolatu için % hidroliz dereceleri (standart sapma ≤ 3)

Enzim tipinin ve hidroliz derecesinin hidrolizat üretmek için seçilmesi, fonksiyonel özellik modülasyonu ve antioksidan aktivitenin artırılması için önemlidir (Li vd., 2015). Genel bir kural olarak proteinlerin hidrolizi, ana proteinin alerjenliğini azaltırken, serbest amino ve karboksil gruplarının ortaya çıkmasıyla peptitlerin çözünürlüğünü arttırmaktadır (Sarmadi ve Ismail, 2010). Bu durumda, peptitlerin hem teknik hem de biyolojik özelliklerinde bir iyileşme söz konusudur. Hidrofobik grupların ortaya çıkması bu durumun aksinin gerçekleşmesine neden olabilir.

4.3. Peptitlerin fraksiyonlara ayrılması

Papain, bromelain ve pepsinle hazırlanan hidrolizatlardan her biri 3 CV olan 2-10 arasında numaralandırılan 9 fraksiyon ve kolona bağlanamayanları içeren fraksiyon (out) toplanarak toplam 10 fraksiyon elde edilmiştir. Kolona bağlanamayanları içeren fraksiyonun (out) peptit konsantrasyonu açısından yoğun ve bu nedenle peptitler arası etkileşim açısından da çeşitliliğin fazlaca olduğu öngörülmüştür. Pozitif yüklü rezine bağlanmayan ve mobil faz ile ilk çıkan nötr veya pozitif yüklü peptitlerin tamamı “out” ve bunların hacmen daha az bir kısmını temsil eden “out fraksiyonu” toplanmıştır. “Out” ve “out fraksiyonu” anyonik içerikteki 9 fraksiyon ile beraber testlere dâhil edilmiştir. PAF, BRF ve PEF sırasıyla papain, bromelain ve pepsine ait fraksiyonları sonrasında gelen sayılar ise fraksiyon numaralarını ifade etmektedir.

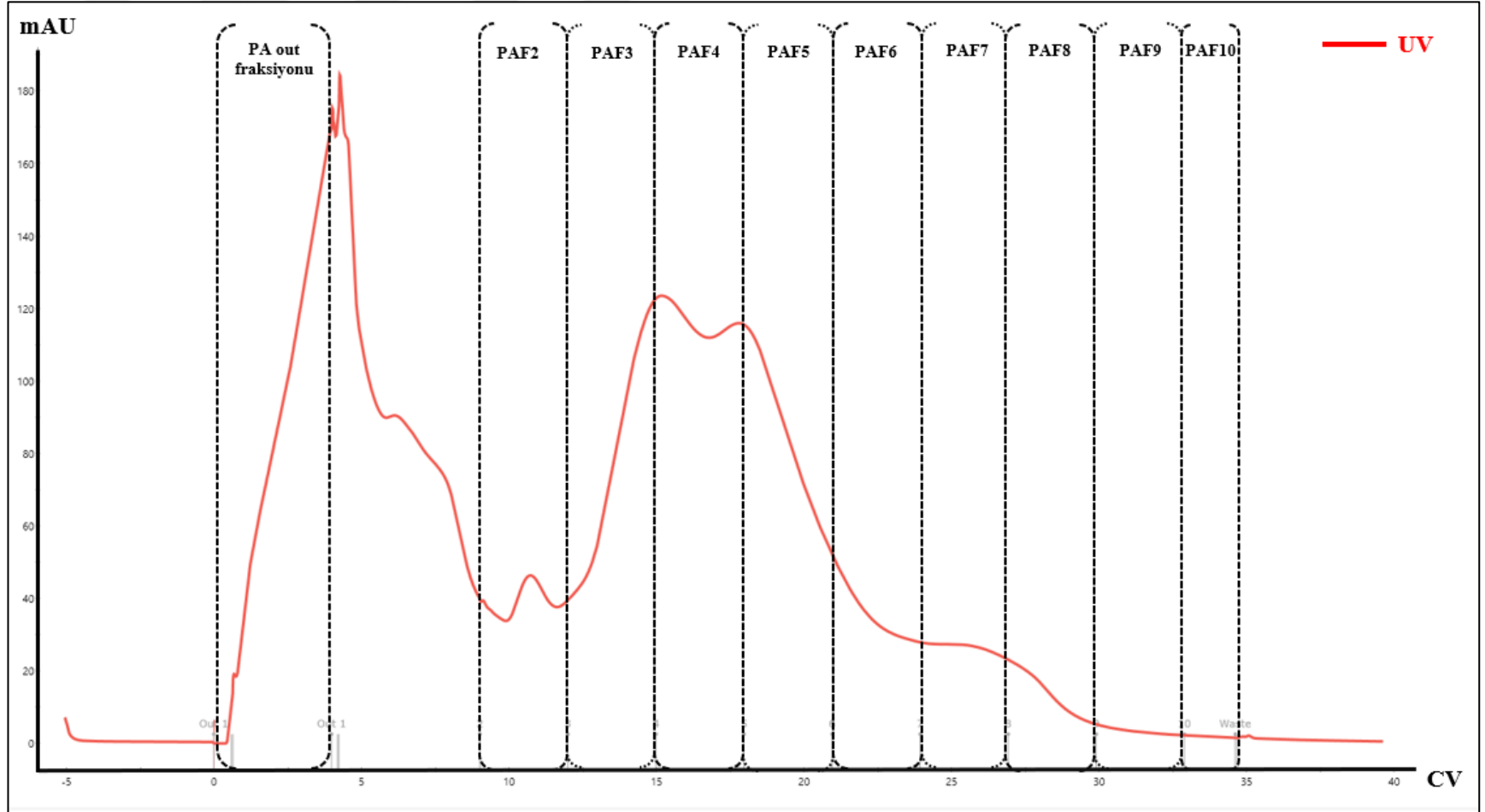
Aşağıda papain (Şekil 4.4), bromelain (Şekil 4.5) ve pepsinle (Şekil 4.6) hazırlanan hidrolizatlara ait 5 ml hacimli HiTrap Capto DEAE kolonu ile kurulan metoda göre 0-100 lineer gradient 25 CV akışta, 3 CV (15 ml) olarak toplanan fraksiyonlara ait kromatogram görüntüleri verilmiştir. Fraksiyonlar 20 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8,0) içinde yer almaktadır.

“Out” fraksiyonları kolondaki pozitif yüklü rezine bağlanmayan ve mobil faz ile ilk çıkan nötr veya pozitif yüklü peptitleri içerir. “F2” ile başlayıp sırasıyla artan numaraya göre elde edilen fraksiyonlar ise ağırlıklı olarak negatif yüklü peptitlerden oluşmaktadır. Elüsyon için tuz konsantrasyonu gittikçe arttığından baştaki fraksiyonların zayıf, sondaki fraksiyonların güçlü negatif yüke sahip olduğu düşünülmektedir.

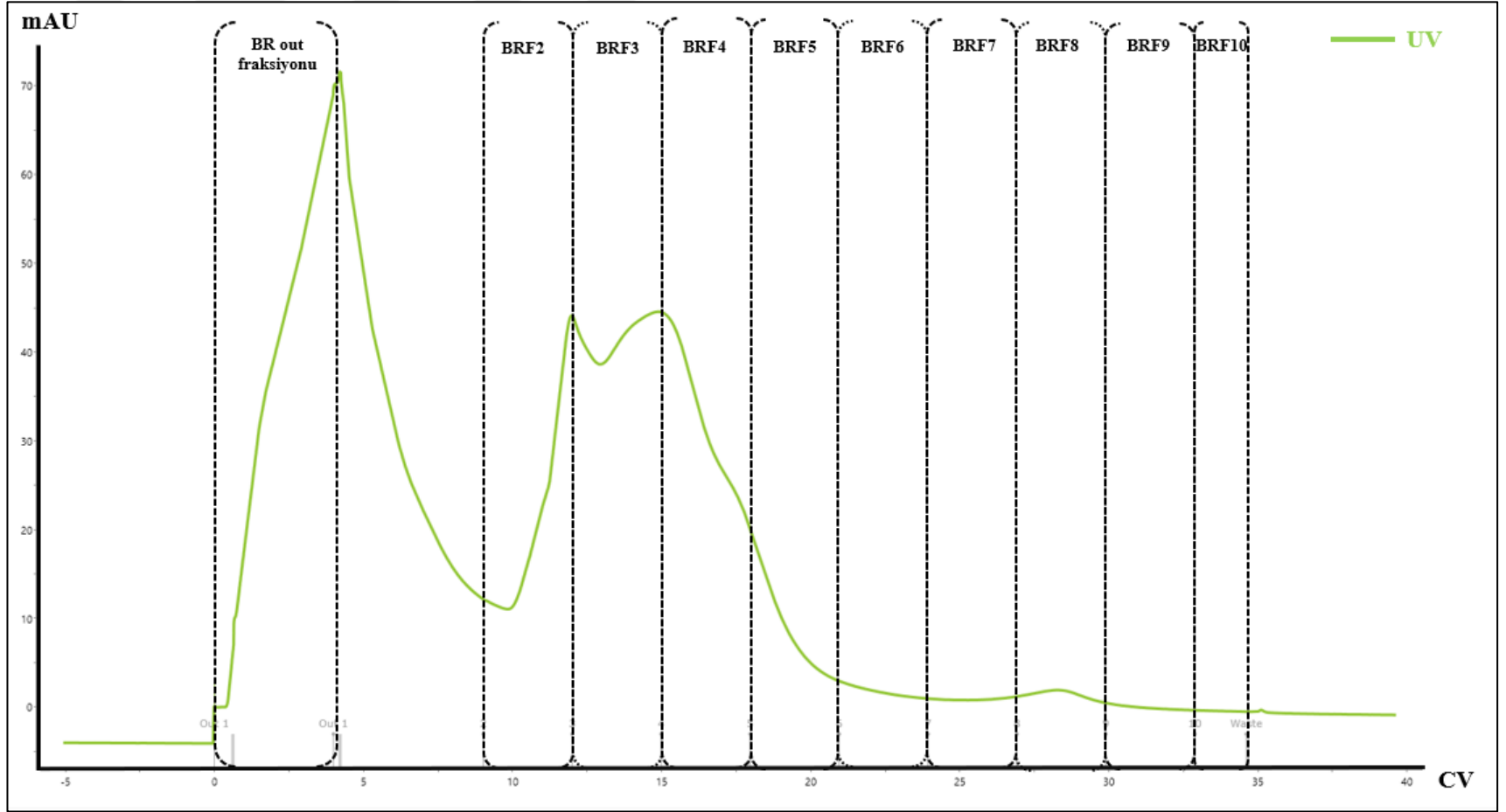
Fraksiyonlar 0-0,8 M NaCl içeriği ile toplanmıştır. ACE önleyici aktivite testi ve ABTS yöntemi testlerinde farklı tuz konsantrasyonlarının analiz sonuçlarını etkilediği görülmüştür. Bu analizler için, her fraksiyonun tuz konsantrasyonu hesap edilerek nihai tuz konsantrasyonu, 0,8 M NaCl değerine sabitlenmiştir. Analizlerde konsantrasyona bağlı değişimi hesaplamak için fraksiyonların değişen oranlarda konsantrasyonları kullanılmıştır.

Tek bir peptidin izolasyonu yapılmasa da fraksiyonlama, bir peptit karışımının karmaşıklığının azaltılması, araştırılan bir biyoaktiviteden sorumlu peptitlerin değerlendirilmesine büyük ölçüde yardımcı olur. Bu amaca ulaşmak için çok aşamalı kromatografik ilkelere dayanan güçlü ayırma teknolojilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlem, analiz edilen numunenin karmaşıklığının ve gözlenen biyoaktiviteden sorumlu aday peptitlerin listesinin azaltılmasına izin verir. Birçok gıda sisteminde onlarca, hatta yüzlerce protein bulunduğu ve bu proteinlerden elde edilebilecek yüzlerce/binlerce peptit söz konusu olduğu için karmaşıklık düzeyi alabildiğince yüksektir.

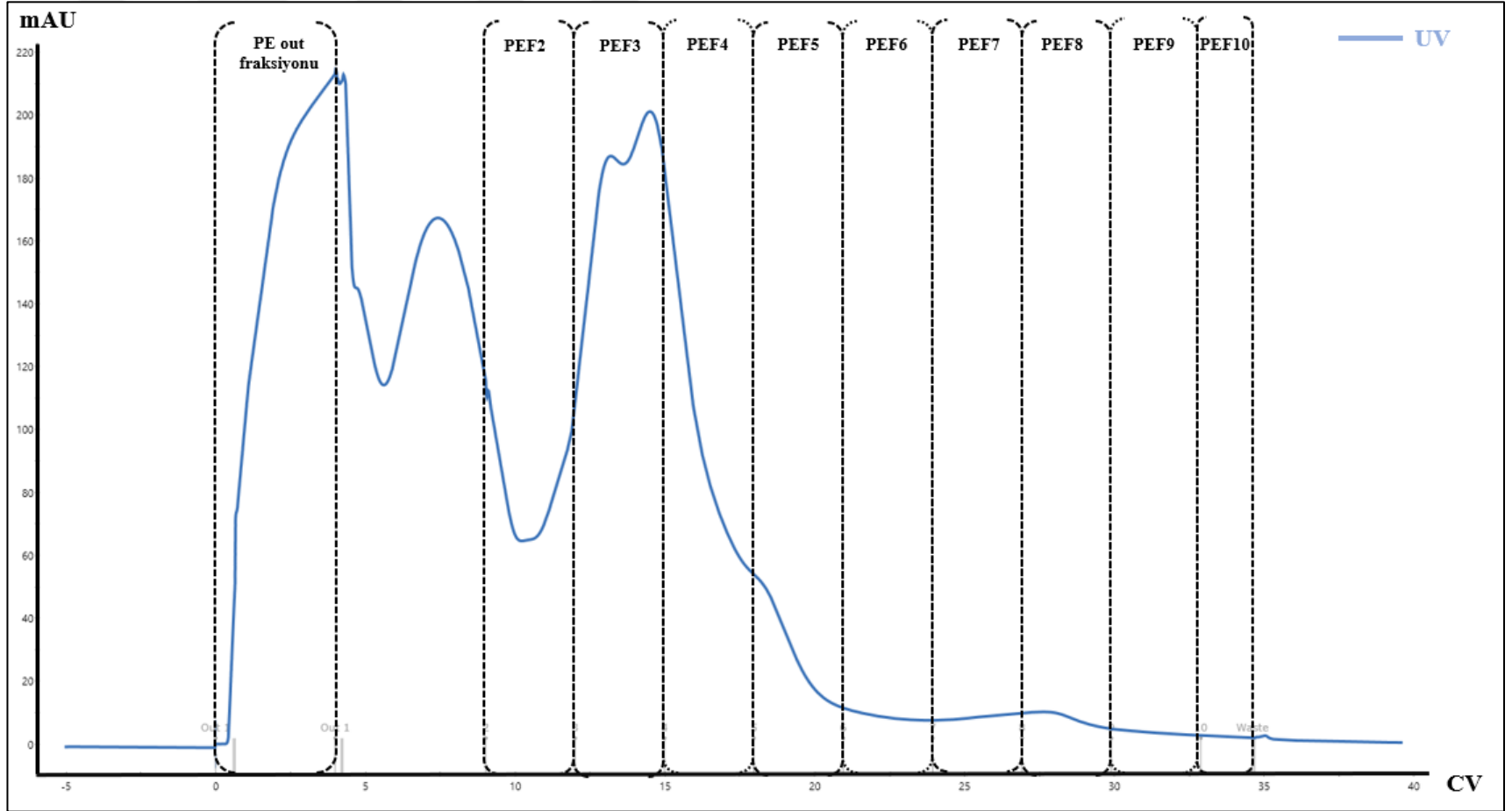




Şekil 4.4: Papain ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri



Şekil 4.5: Bromelain ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri



Şekil 4.6: Pepsin ile elde edilen hidrolizata ait fraksiyon bölgeleri

4.4. Biyoaktivite testleri

Literatürde fındık proteinleri, peptitleri ile olan çalışmalar genelde kompozisyon belirleme (Köksal vd., 2006), alerjen tespiti ve çeşitli antioksidatif özellikleri belirlemeye (Shahidi, Alaşalvar ve Liyana-Pathirana, 2007) yöneliktir. Fındık proteinlerinden farklı uygulamalarla oluşan peptitlerin biyoaktivitesi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

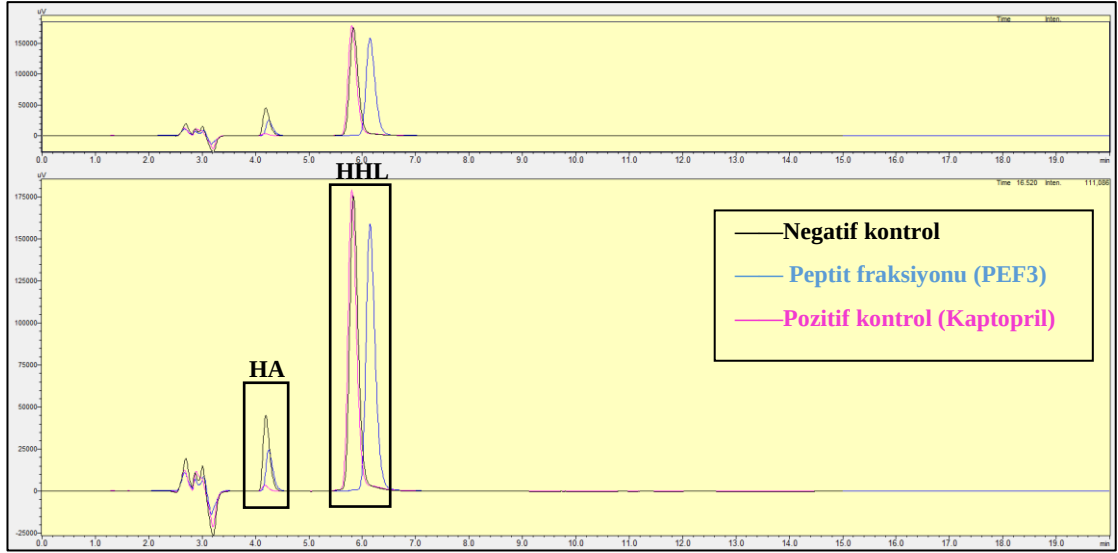
4.4.1. ACE önleyici aktivite testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ait fraksiyonların *in vitro* ACE önleyici aktiviteleri, hippürik asit oluşumu ile belirlenmiştir.

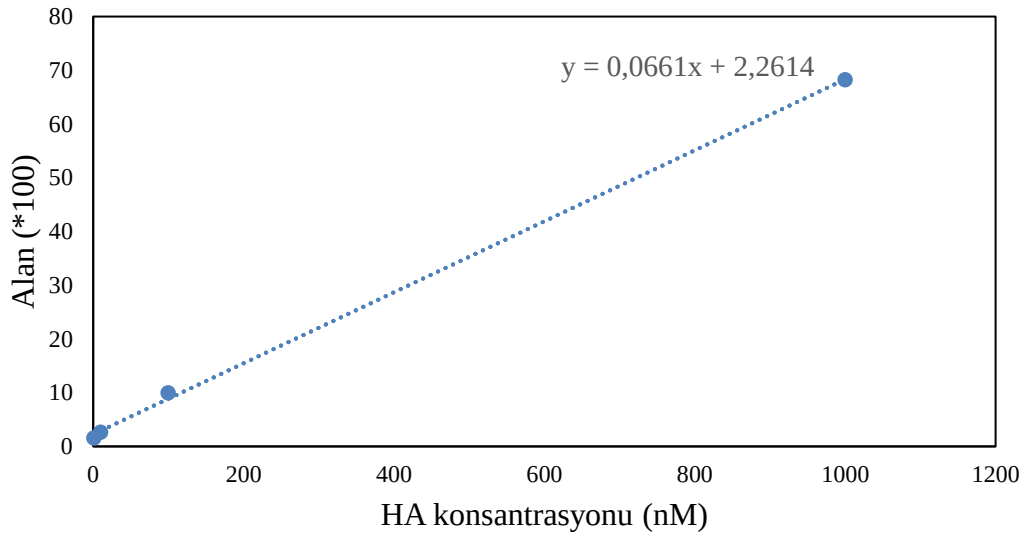
Hippüril-His-Leu bileşiği substrat olarak kullanılıp ACE aktivitesi ile bu kompleksin, hippürik asit ile His-Leu dipeptidine ayrıştırılmasına dayalı bir analiz yapılmıştır.

HPLC sisteminde yapılan analize ait Şekil 4.7 üzerinde negatif kontrol, pozitif kontrol ve fraksiyonlardan birine ait kromatogram görüntüsü verilmiştir. Analiz süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. HA 4-4,5 dakikalar arasında, HHL 5-5,5 dakikalar arasında sinyal vermiştir. Negatif kontrolde hiçbir inhibitör olmadığı için en yüksek HA alanına sahiptir ve bu alan %100 kabul edilir. Pozitif kontrolde HA alanında azalma olduğu ve peptit fraksiyonun da pozitif kontrole benzer şekilde HA alanında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Hippürik asit standardı 0,1-1.000 nM konsantrasyonlarında hazırlanarak HA kalibrasyon grafiği kullanılarak kantitatif ACE inhibisyonu da hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

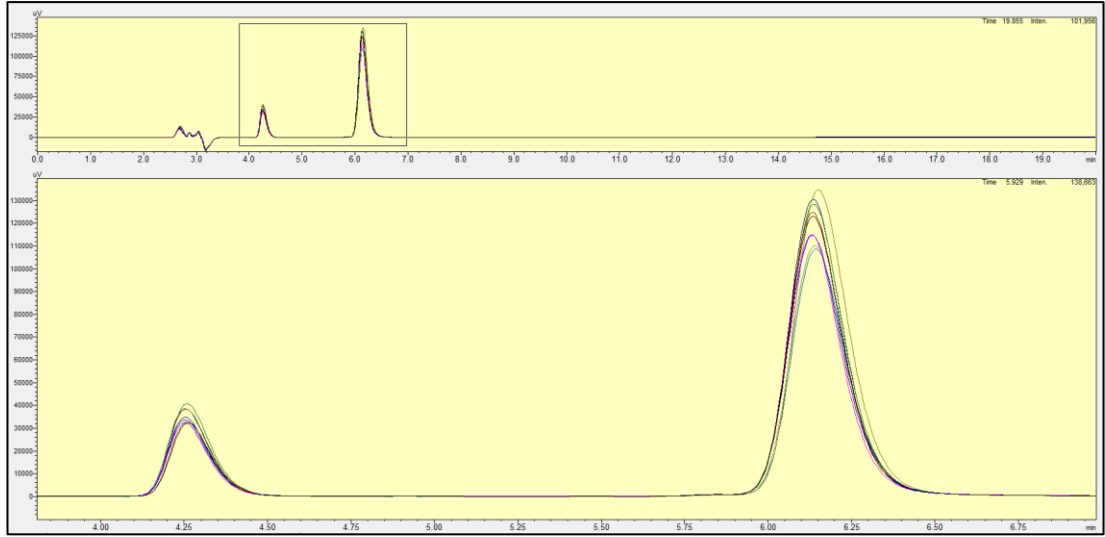


Şekil 4.7: Negatif ve pozitif kontrole göre peptit fraksiyonu HA alanı



Şekil 4.8: Hippürik asit kalibrasyon eğrisi (standart sapma $\leq$ %3)

Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının HA alanlarına ait kromatogram görüntüsü verilmiştir (Şekil 4.9). Fraksiyonların negatif kontrole göre farklı oranlarda HA alanında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bromelain ve pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlar da benzer şekilde negatif kontrole göre farklı oranlarda HA alanında azalmaya neden olmuştur.



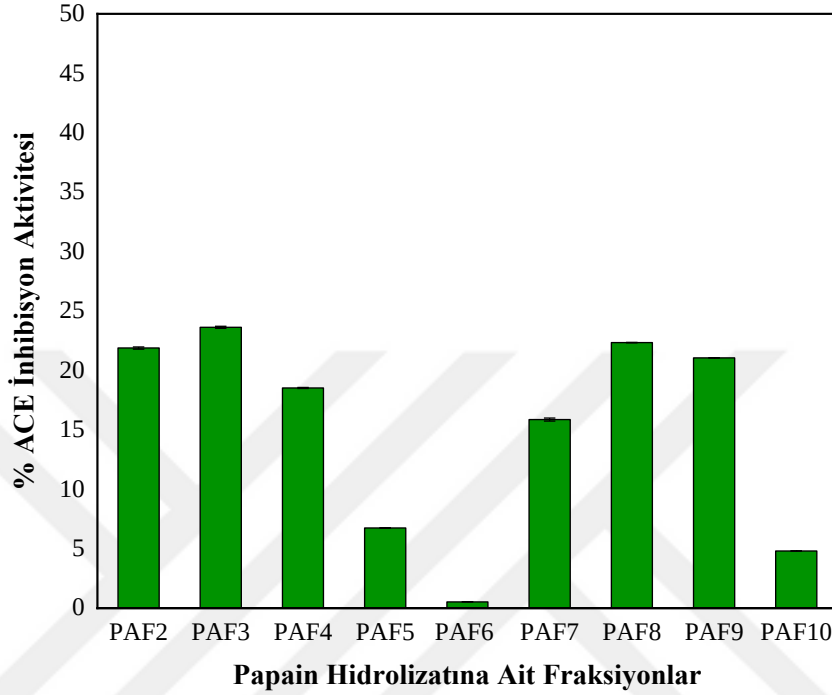
Şekil 4.9: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının HA alanları

Papain enzimi ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatı ve hidrolizata ait fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Tablo 4.4.1.1’de verilmiştir. Hidrolizatın ve out kısmının en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.4.1.1: Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ACE İnhibisyon Aktivitesi
Papain hidrolizatı	98,62±0,2
PA out	93,13±0,1
PA out fraksiyonu	47,23±0,2
PAF2	21,88±0,1
PAF3	23,63±0,1
PAF4	18,52±0,1
PAF5	6,75±0,1
PAF6	0,53±0,1
PAF7	15,86±0,1
PAF8	22,34±0,1
PAF9	21,05±0,0
PAF10	4,81±0,0

Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.10 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF3, PAF8 ve PAF2 göstermektedir.



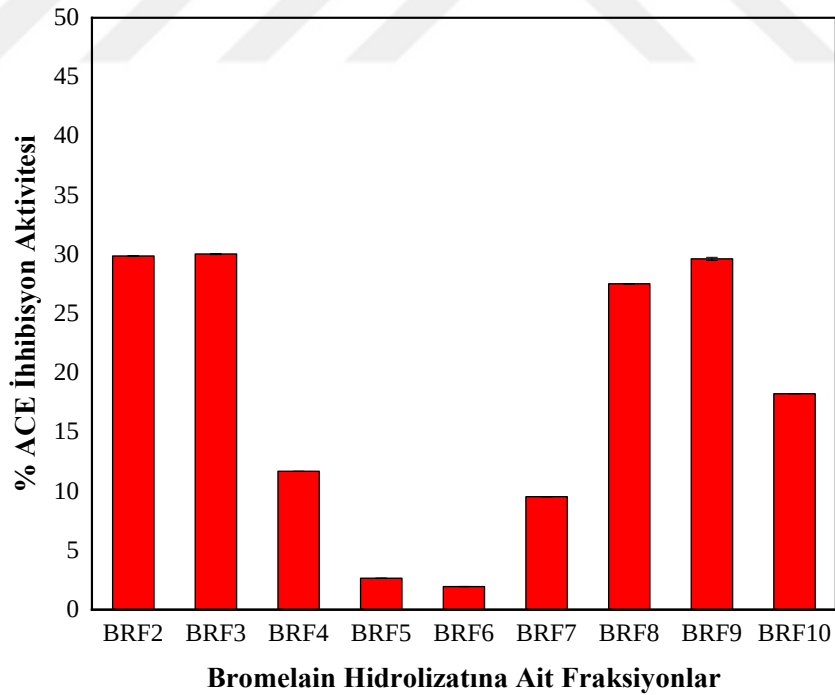
Şekil 4.10: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (standart sapma $\leq$ %3)

Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir (Tablo 4.4.1.2). Hidrolizatın ve out kısmının en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.11 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF3, BRF2 ve BRF9 göstermektedir.

Tablo 4.4.1.2: Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ACE İnhibisyon Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	86,98±0,1
BR out	63,00±0,3
BR out fraksiyonu	48,24±0,1
BRF2	29,88±0,1
BRF3	30,04±0,1
BRF4	11,69±0,1
BRF5	2,66±0,0
BRF6	1,95±0,1
BRF7	9,54±0,0
BRF8	27,53±0,1
BRF9	29,64±0,1
BRF10	18,25±0,1



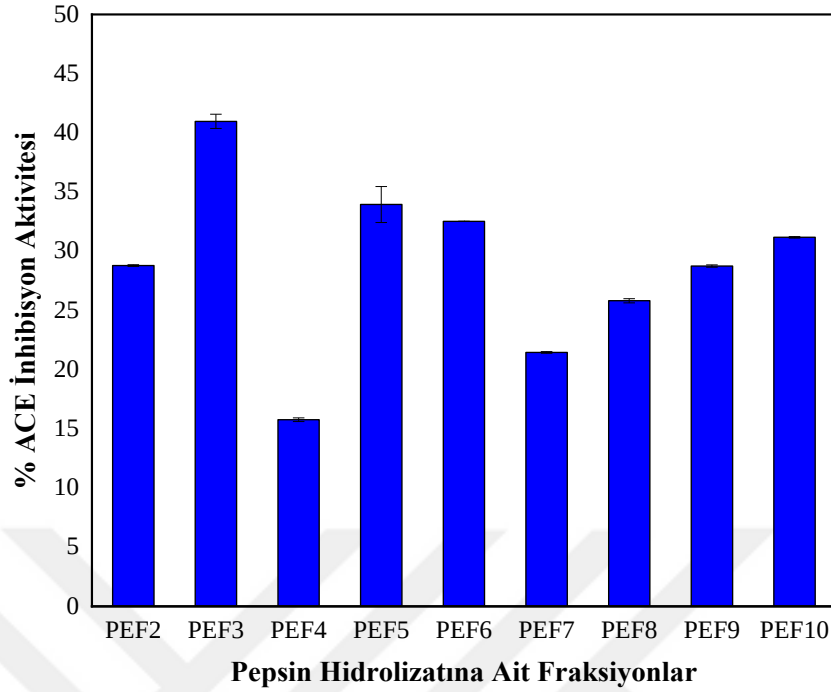
Şekil 4.11: Bromelain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (standart sapma ≤%3)

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir (Tablo 4.4.1.3). Hidrolizatın ve out kısmının en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.4.1.3: Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ACE İnhibisyon Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	98,47±0,1
PE out	96,42±0,1
PE out fraksiyonu	85,36±0,2
PEF2	28,79±0,1
PEF3	40,97±0,6
PEF4	15,77±0,1
PEF5	33,95±1,5
PEF6	32,52±0,0
PEF7	21,45±0,1
PEF8	25,81±0,2
PEF9	28,74±0,1
PEF10	31,18±0,1

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.12 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF3, PEF5 ve PEF6 göstermektedir.

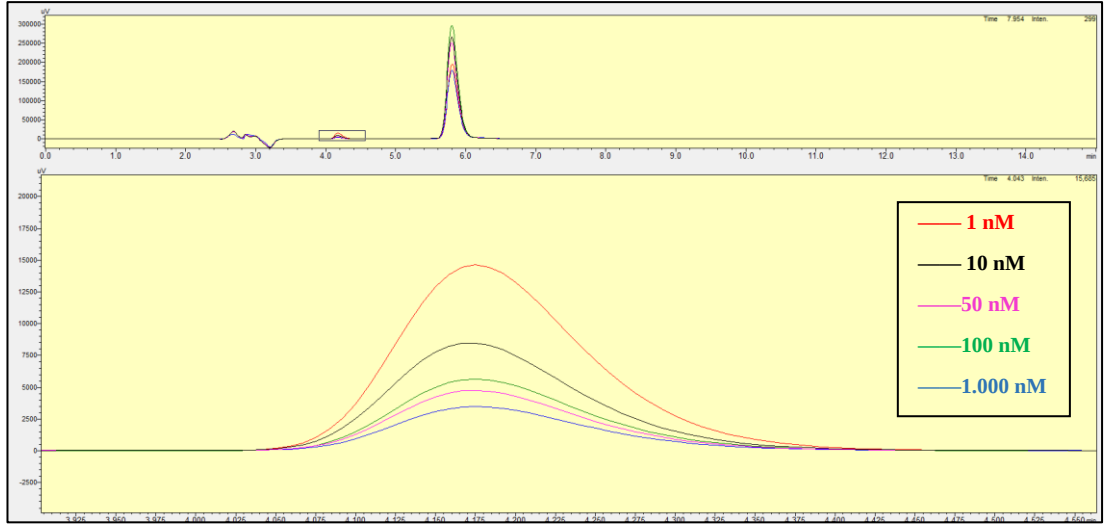


Şekil 4.12: Pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

ACE inhibisyon aktivitesi gösteren peptitlerin sentetik bir ACE inhibitörü olan Kaptopril'e göre kıyaslanması açısından Kaptopril farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak çalışılmıştır (Tablo 4.4.1.4). Şekil 4.13 üzerinde Kaptopril'e ait kromatogram görüntüsünde Kaptopril konsantrasyonunun artmasıyla HA alanının da azaldığı görülmektedir.

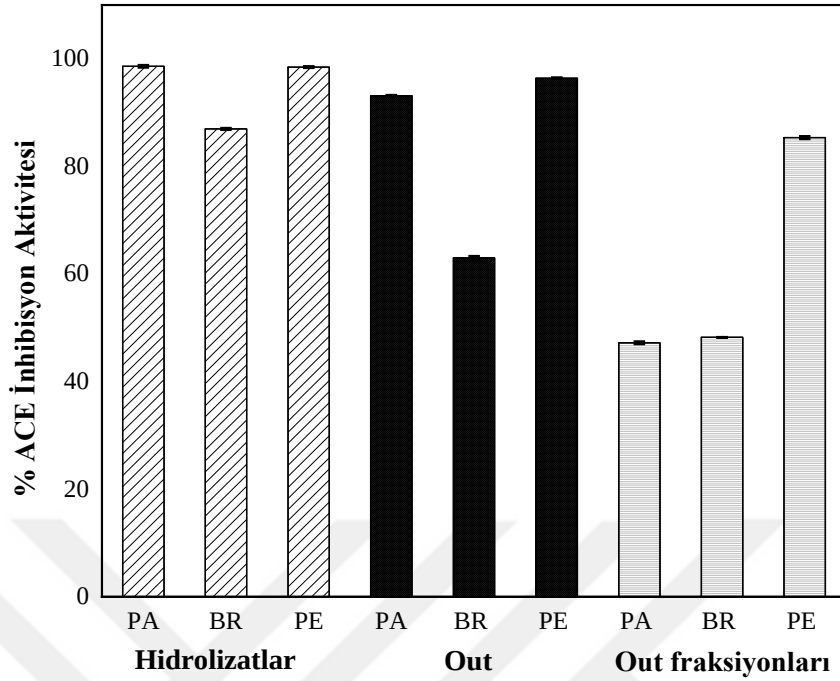
Tablo 4.4.1.4: Kaptopril'e ait ortalama % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Kaptopril konsantrasyonu (nM)	Ortalama % ACE İnhibisyon Aktivitesi
1	68,93±1,2
5	81,20±0,4
10	84,56±1,8
25	92,92±0,1
50	92,48±0,5
100	90,00±0,3
1.000	95,23±0,1



Şekil 4.13: Kaptopril (pozitif kontrol) için farklı konsantrasyonlardaki hippürik asit alanları

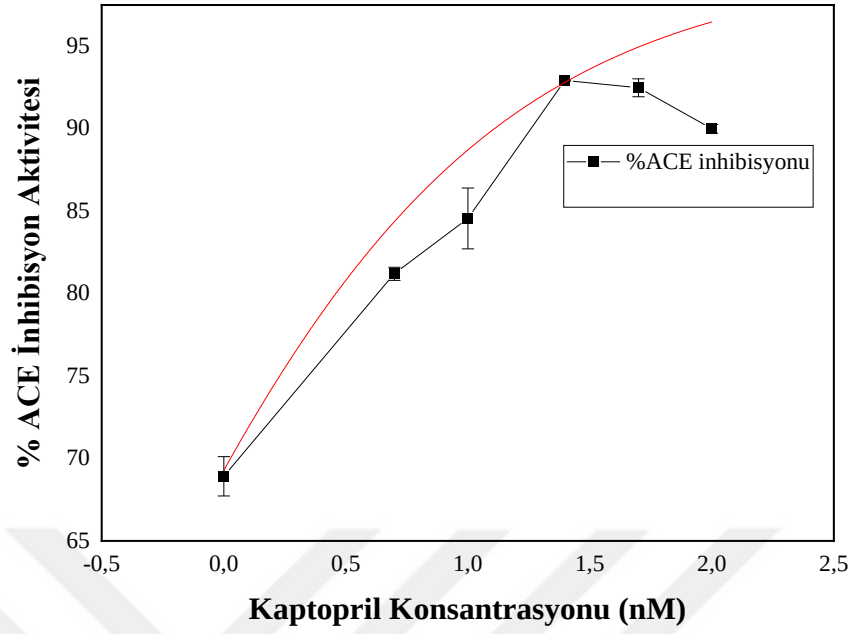
Yapılan çalışmada üç farklı enzimle elde edilen hidrolizatlardan, en yüksek aktivitenin hidrolizatlara ve out kısmına ait olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin hidrolizat, out ve out fraksiyonlarının peptit konsantrasyonu ve çeşitliliği açısından fraksiyonlara göre yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle üç hidrolizat ve out kısmı, fraksiyonlardan ayrı olarak değerlendirilmelidir. Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmı % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.14 üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.14: Papain, bromelain, pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatları ve fraksiyonlamadaki out kısmının % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri (standart sapma $\leq$ %3)

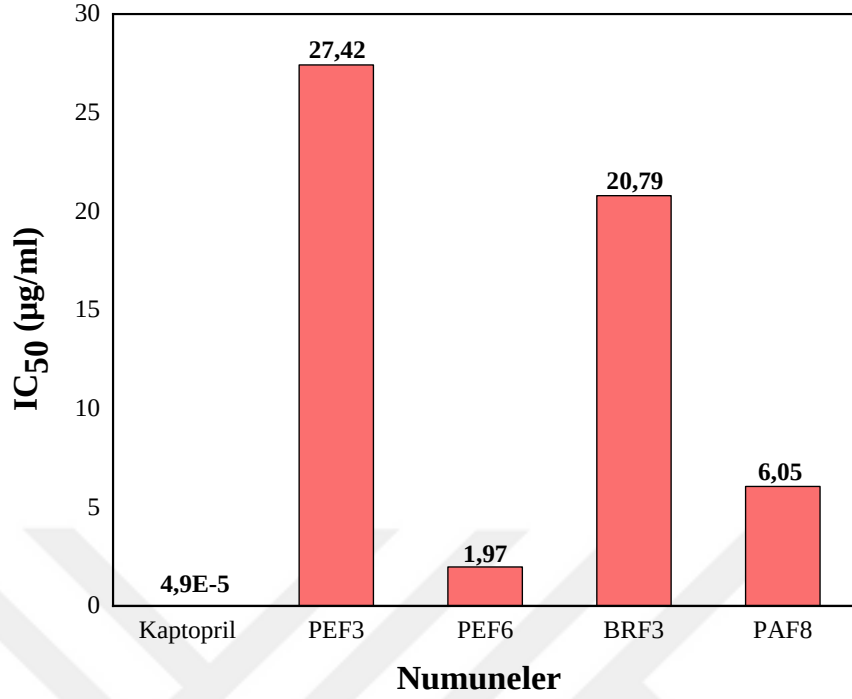
Tansiyonun düzenlenmesinde ACE'nin önemli rolleri nedeniyle, bu enzimin inhibisyonu hipertansiyonu tedavi etmek için kullanılmıştır (Coppey vd., 2006). IC_{50} değeri, deney koşulları altında ACE aktivitesinin %50'sini inaktive etmek için gerekli inhibitör miktarıdır (Thewissen vd., 2011). Literatürde bulunan ACE inhibitör aktivitesi gösteren peptitlerle ve pozitif kontrol olan Kaptopril ile karşılaştırmak amacıyla en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesi gösteren peptitler için IC_{50} çalışması yapılmıştır. Farklı miktarlarda peptit konsantrasyonuna sahip fraksiyonlar için dört farklı oranda peptit konsantrasyonu hazırlanarak % ACE inhibisyon aktivitesi hesaplanmıştır.

Kaptopril için IC_{50} grafiği Şekil 4.15 üzerinde gösterilmiştir. Çalışmada kaptopril için IC_{50} , $4,9E-5$ μ g/ml (0,22 nM) olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda Kaptopril IC_{50} değeri 0,016 μ M (Garza vd., 2017), 0,019 μ M (Li vd., 2005) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.15: Pozitif kontrol numunesi (Kaptopril) için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

Çalışmada, sırasıyla en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesi gösteren PEF3, BRF3, PAF8 ve PEF6 fraksiyonları için IC_{50} grafikleri gösterilmiştir (Şekil 4.16). PAF8 fraksiyonu için IC_{50} değeri 6,05 $\mu\text{g/ml}$, BRF3 fraksiyonu için IC_{50} değeri 20,79 $\mu\text{g/ml}$, PEF3 fraksiyonu için IC_{50} değeri 27,42 $\mu\text{g/ml}$, PEF6 fraksiyonu için IC_{50} değeri 1,97 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. ACE inhibitör aktivitesinin etkinliği sentetik ilaçlarındaki kadar yüksek olmasa da farklı gıda proteinlerinden izole edilen birçok doğal ACE inhibitör peptit, hipertansiyonun önlenmesinde ve hafif hipertansif bireylerin ilk tedavisinde uygulanabilir (Li, Han ve Chen, 2008).



Şekil 4.16: Pozitif kontrol ve en yüksek ACE önleyici aktiviteye sahip fraksiyonların IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (standart sapma ≤%3)

Bitkisel kaynaklı proteinlere enzim uygulamasıyla oluşan ve sekansları literatürde raporlanan çalışmalarla benzer IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Bitki özütleri ve gıdadan türetilen ACE inhibitör peptitler sentetik ilaçlara alternatif olarak kullanılmıştır ve biyoaktif peptitlerin bilinen en iyi sınıfı olarak kabul edilmektedir (Jimsheena ve Gowda, 2011). Ceviz proteinlerine proteaz muamelesi ile elde edilen WPERPPQIP (1033,42 Da) peptit sekansında IC₅₀ değeri 25,67 µg/ml olarak bulunmuştur (Liu vd., 2013). Bu çalışmada UF (3 kDa moleküler ağırlık sınırı), SEC (Sephadex G-15), IEX ve HPLC yöntemleri ile peptit saflaştırılmıştır. Kanola proteinleri ile yapılan çalışmada alkalaz ile muamele sonucu elde edilen FL sekansına sahip peptide ait IC₅₀ değeri 1,33 µM ve VSV sekansına sahip peptide ait IC₅₀ değeri 0,15 µM olarak bulunmuştur (Wu, Aluko ve Muir, 2008). Kudret narı tohumu proteinine termolisin muamelesi sonucu oluşan VSGARY (708 Da) sekansına sahip peptide ait IC₅₀ değeri 8,64 µM olarak bulunmuştur (Priyanto vd., 2015). *Terminalia chebula* ağacı proteinine pepsin muamelesi sonucu oluşan DENSKEF (738,5 Da) sekansına sahip peptide ait IC₅₀

değeri 100 μ M olarak bulunmuştur (Sornwatana vd., 2015). Çalışmanın sonuçları literatürdeki bitkisel kaynaklı peptitler ile karşılaştırılabilir sonuçlar göstermektedir. García vd. (2015) çalışmasında, üç enzim ile üretilen hidrolizatlardan farklı peptitlerin oluşmasındaki en büyük nedenin enzimlerin yapısal ve işlevsel farklılığından kaynaklandığı belirtmiştir. Kullanılan enzimden bağımsız olarak, sıcaklık, hidroliz süresi ve enzim/protein oranı, ACE inhibitör aktivitesine sahip peptit üretiminde önemli faktörler olarak kabul edilmektedir (Cheung vd., 2009; Priyanto vd., 2015; García vd., 2015; Chiang vd., 2006). Proteolitik enzimin substrata özgüllüğü nedeniyle, hidrolizatların peptit bileşimi ve dolayısıyla ACE inhibitör aktiviteleri değişmektedir (He, Liu ve Ma, 2013; Van Der Ven vd., 2002).

ACE inhibitör peptitler genellikle kısa zincirli olduğundan, enzimlerin yüksek bir hidroliz derecesi olmalıdır (De Gobba, Tompa ve Otte, 2014; Espejo-Carpio vd., 2013). Çalışmada kullanılan enzimlerden papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait hidroliz derecesinin %46-74 arasında değiştiği hesaplanmıştır. Dolayısıyla, çalışmada elde edilen üç hidrolizat ve onların fraksiyonları yüksek ACE önleyici aktivite potansiyeline sahiptir. Bu sonuçlara paralel olarak başta pepsin olmak üzere papain ve bromelain enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatı ve hidrolizattan elde edilen fraksiyonlar yüksek ACE önleyici aktiviteye sahiptir. Pepsin, aromatik veya karboksilik l-amino asitlerle bağ içeren peptitleri tercih ederek geniş bir ayırma/kesme özelliğine sahiptir. Tercihen C- terminalini peptitlerin ACE önleme kapasitesi için önemli amino asitler olan Phe ve Leu'e ayırır (Murray ve FitzGerald, 2007; Sornwatana vd., 2015).

4.4.2. Antidiyabetik aktivite testleri

Çalışmada, farklı etki mekanizmasıyla antidiyabetik özellik gösteren alfa-amilaz inhibitör, alfa-glukosidaz inhibitör, DPP-IV inhibitör peptitleri belirlemek amacıyla testler yapılmıştır.

4.4.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların DPP-IV önleyici aktiviteleri, substrattan (Gly-Pro-pNA) salınan pNA miktarının absorbans değerinin 405 nm dalga boyunda ölçülmesiyle belirlenmiştir.

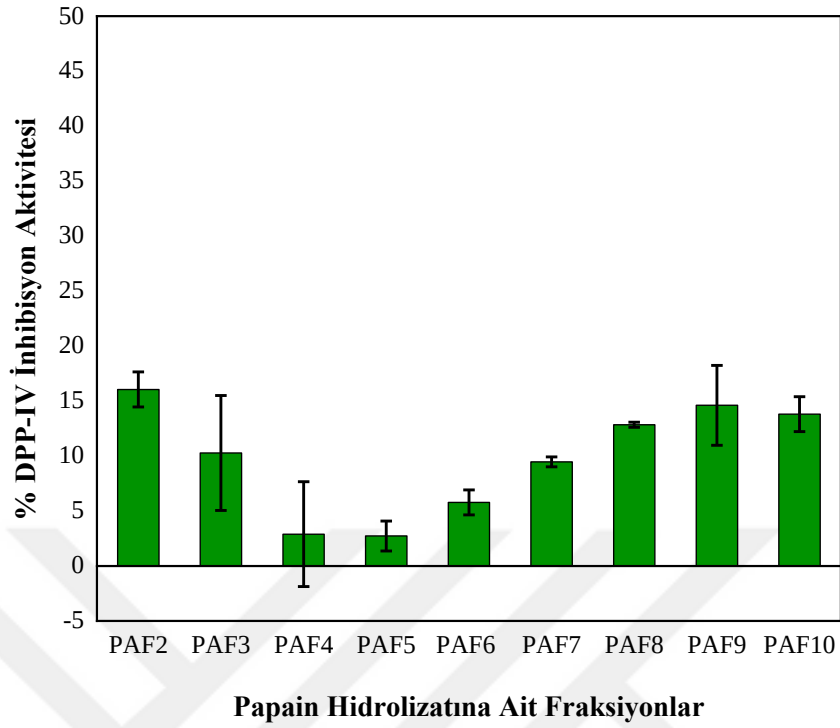
Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir (Tablo 4.4.2.1.1). Hidrolizatın aktivite göstermediği ve out kısmının düşük aktivite gösterdiği görülmüştür.

Tablo 4.4.2.1.1: Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % DPP-IV İnhibisyon Aktivitesi
Papain hidrolizatı	-
PA out	3,37±0,4
PA out fraksiyonu	3,85±2,1
PAF2	16,05±1,6
PAF3	10,27±5,2
PAF4	2,89±4,8
PAF5	2,73±1,4
PAF6	5,78±1,1
PAF7	9,47±0,4
PAF8	12,84±0,2
PAF9	14,61±3,6
PAF10	13,80±1,6

Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.17 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda % DPP-IV inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF2, PAF9 ve PAF10 göstermektedir.

Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir (Tablo 4.4.2.1.2). BRF3 fraksiyonunun aktivite göstermediği ve out kısmının düşük aktivite gösterdiği görülmüştür.

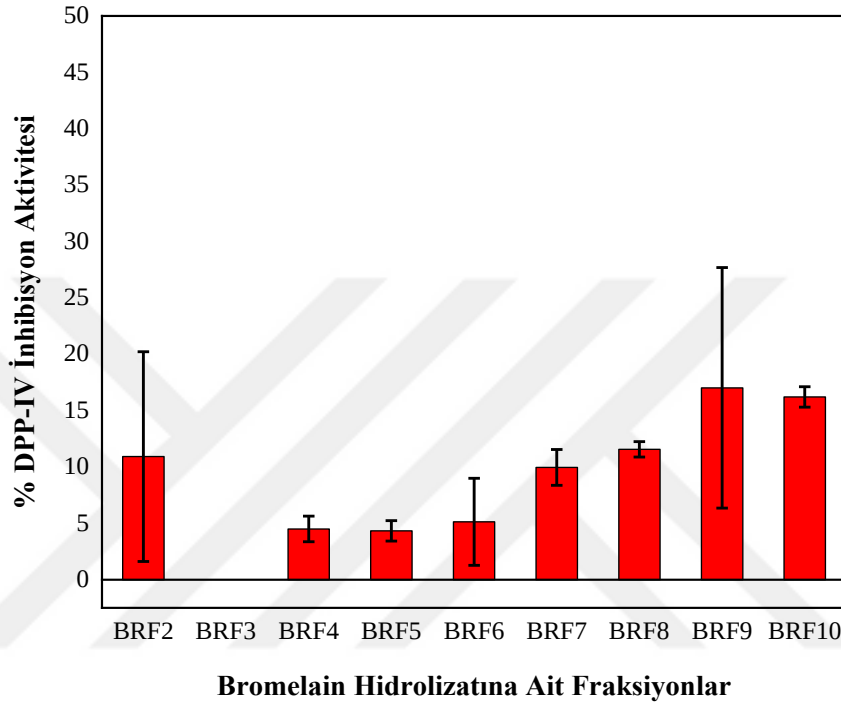


Şekil 4.17: Papain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonların % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Tablo 4.4.2.1.2: Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % DPP-IV İnhibisyon Aktivitesi
Bromelain hidrolizatı	3,37±4,1
BR out	5,30±2,3
BR out fraksiyonu	0,48±0,0
BRF2	10,91±9,3
BRF3	-
BRF4	4,50±1,1
BRF5	4,33±0,9
BRF6	5,14±3,9
BRF7	9,95±1,6
BRF8	11,56±0,7
BRF9	17,01±10,7
BRF10	16,21±0,9

Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.18 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda % DPP-IV inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF9, BRF10 ve BRF8 göstermektedir.



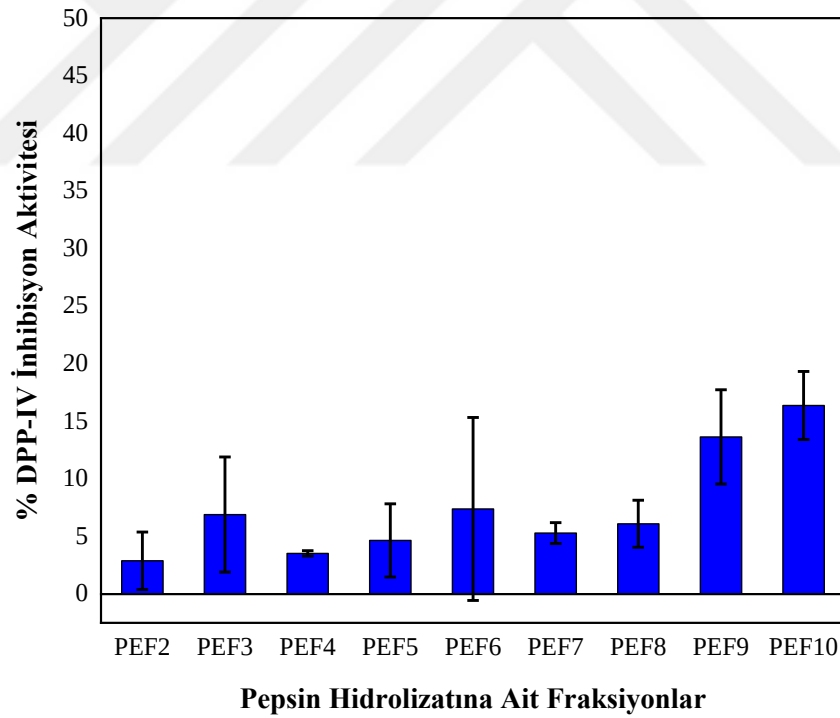
Şekil 4.18: Bromelain ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri verilmiştir (Tablo 4.4.2.1.3). Hidrolizat ve fraksiyonların tamamının aktivite gösterdiği görülmektedir.

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.19 üzerinde gösterilmiştir. Fraksiyonların değişen oranlarda % DPP-IV inhibisyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF10, PEF9 ve PEF6 göstermektedir.

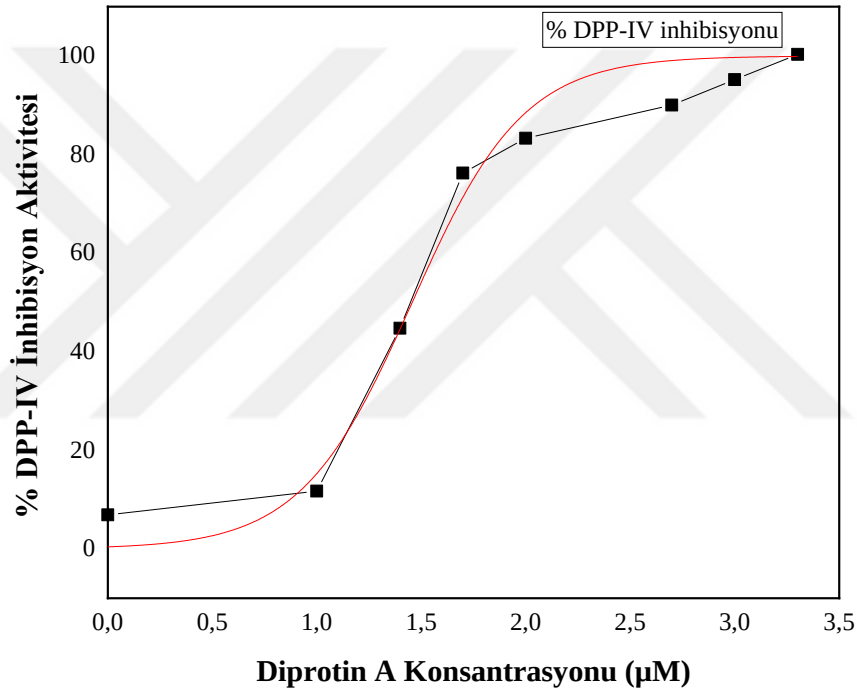
Tablo 4.4.2.1.3: Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % DPP-IV İnhibisyon Aktivitesi
Pepsin hidrolizatı	8,19±3,6
PE out	3,37±0,4
PE out fraksiyonu	1,44±2,3
PEF2	2,89±2,5
PEF3	6,90±5,0
PEF4	3,53±0,2
PEF5	4,65±3,2
PEF6	7,38±7,9
PEF7	5,30±0,9
PEF8	6,10±2,1
PEF9	13,64±4,1
PEF10	16,37±2,9



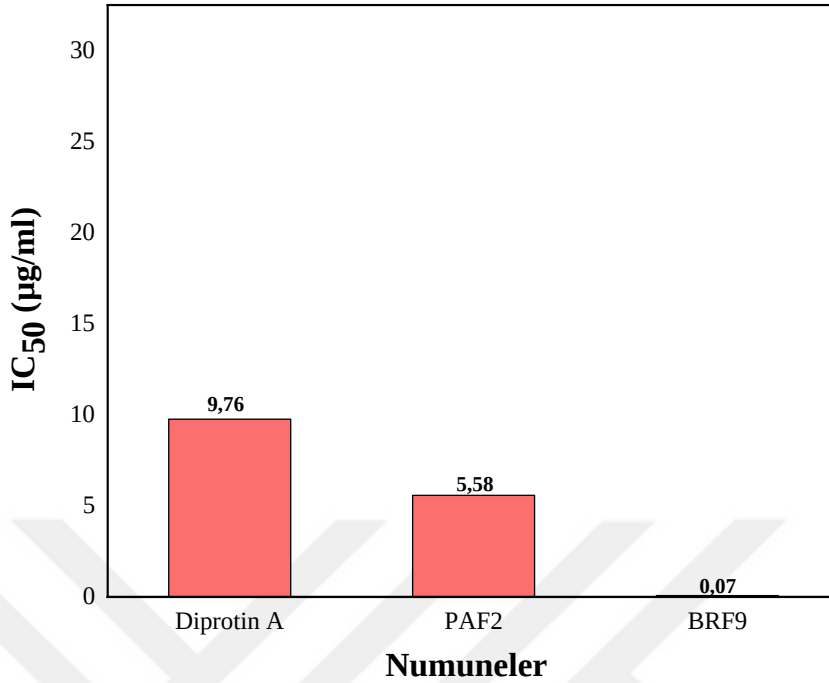
Şekil 4.19: Pepsin ile elde edilen fındık proteini izolatının hidrolizatına ait fraksiyonlarının % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Çalışmada hidrolizatların ve bunlardan elde edilen fraksiyonların DPP-IV inhibisyon aktivitesi etkinliğini tespit etmek amacıyla pozitif kontrol olan Diprotin A'dan 1-2.000 μM arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanarak IC_{50} değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.20). Diprotin A için IC_{50} değeri 9,76 $\mu\text{g/ml}$ (28,59 μM) olarak bulunmuştur. Literatürdeki benzer çalışmalarda ton balığı pişirme suyu hidrolizatları peptitlerinde Diprotin A için IC_{50} değeri 24,7 μM (Huang vd., 2012), süt proteinleri peptitlerinde Diprotin A için IC_{50} değeri 8,49 μM (Nongonierma ve FitzGerald, 2013) ve 3,5 μM (Jia vd., 2020) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20: Pozitif kontrol numunesi (Diprotin A) için IC_{50} değerlerinin belirlenmesi (standart sapma $\leq\%3$)

Çalışmada, sırasıyla en yüksek % DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren BRF9, PEF10, PAF2 fraksiyonlarıdır. PAF2 ve BRF10 fraksiyonları için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.21) ancak PEF10 fraksiyonu kromatogram alanı hesap edilemeyecek düzeyde olduğundan belirlenememiştir. PAF2 fraksiyonu için IC_{50} değeri 5,58 $\mu\text{g/ml}$, BRF9 fraksiyonu için IC_{50} değeri 0,07 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21: Pozitif kontrol ve en yüksek DPP-IV önleyici aktiviteye sahip fraksiyonların IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (standart sapma ≤%3)

Literatürdeki çalışmalarda acı bakla proteininden elde edilen LTFPGSAED peptit sekansının IC₅₀ değeri 207,5 µM (Lammi vd.,2018), fasulye proteininden elde edilen KTYGL peptit sekansının IC₅₀ değeri 59,3 µM (Mojica, Luna-Vital ve González de Mejía, 2017), buğday gluteninden elde edilen QPF sekanslı peptide ait IC₅₀ değeri 71,7 µM (Taga vd., 2017) olarak bulunmuştur.

Ton balığı pişirme suyu hidrolizatlarında 78 ile 116 µM arasında IC₅₀ değerlerine sahip üç DPP-IV inhibe edici peptit tanımlanmıştır (Huang vd., 2012). Bu peptitler, boyutları 2 ile 5 amino asit arasında değişen, tercih edilen DPP-IV inhibe edici peptitlerden çok daha uzun olan 13-15 amino asit kalıntısı içermektedir. Bu bulgular, DPP-IV inhibe edici aktivitenin uzunluklarına ek olarak amino asitlerin bileşimine ve dizilimine bağlı olabileceğini öne sürmelerini sağlamıştır. Lacroix ve Li-Chan (2012), yüksek molekül ağırlıklı peptitlerde görülen DPP-IV inhibitör aktivitesinin, sentetik substrat ve DPP-IV kombinasyonuna rekabetçi bir şekilde müdahale etmek için substrat analogları olarak hareket edebilen DPP-IV substrat benzeri yapısal özelliklerine atfedilebileceğini göstermiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ait fraksiyonların tamamına yakına DPP-IV önleyici aktiviteye sahiptir. Bu aktivite değeri en fazla yaklaşık %17 olarak BRF9 fraksiyonuna aittir. Pozitif kontrol olan Diprotin A için IC_{50} 9,76 $\mu\text{g/ml}$ ve BRF9 fraksiyonu için IC_{50} değeri 0,07 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, fraksiyonların tamamına yakınında düşük konsantrasyonda olan ve etkinliği yüksek DPP-IV önleyici aktiviteye sahip peptitlerin olduğu düşünülmektedir. Yapılan LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler ile bu bulgular desteklenmektedir (Bölüm 4.5).

4.4.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ait fraksiyonların alfa-amilaz önleyici aktiviteleri, örneklerdeki α -amilaz enziminin etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarındaki artışın DNS aracılığıyla absorbans değerinin 540 nm dalga boyunda ölçülmesiyle belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Farklı örneklerde % alfa-amilaz önleyici aktivite değerlerinin değişimi. Ok yönünde % alfa-amilaz önleyici aktivite değerleri artmaktadır.

Papain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatında % alfa-amilaz önleyici aktivite saptanmamıştır. Fraksiyonlardan sadece PA out fraksiyonu, $7,83 \pm 0,1$ ortalama % alfa-amilaz önleyici aktiviteye sahiptir.

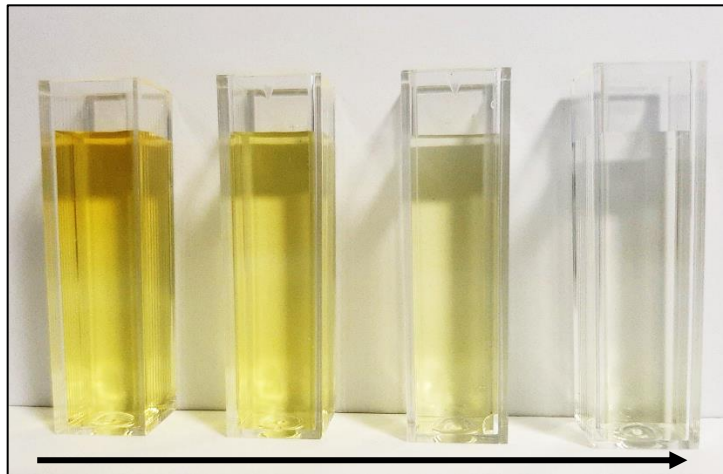
Bromelain enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatında % alfa-amilaz önleyici aktivite $1,73 \pm 0,1$ olarak bulunmuştur. Fraksiyonlardan sadece BRF2, $4,60 \pm 0,1$ ortalama % alfa-amilaz önleyici aktiviteye sahiptir.

Pepsin enzimi ile elde edilen fındık hidrolizatı ve fraksiyonlarına ait ortalama % alfa-amilaz önleyici aktivite saptanmamıştır.

Bitkisel kaynaklı proteinlerden antidiyabetik peptitler belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda kimyon tohumu proteinlerinde IC_{50} değeri $0,04 \mu M$ olan (Siow, Lim ve Gan, 2017) ve fasulye proteinlerinde (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) IC_{50} değeri $6,08 mM$ olan (Ngoh, Lim ve Gan, 2016) alfa-amilaz inhibitör özellikli peptitler tespit edilmiştir. Yu vd. (2012) ve Garza vd. (2017), Alfa-amilaz inhibisyonu için Phe, Leu, Pro ve Gly kalıntılarının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde, Arise, Yekeen ve Ekun (2016), alfa-amilazın, Lys gibi katyonik kalıntılar ve Phe, Tyr ve Trp gibi dallı zincir kalıntıları içeren peptitlere bağlandığını ileri sürmüştür. Bu, kısmen her üç hidrolizatın neden yüksek bir alfa-amilaz inhibe edici aktiviteye sahip olmadığını açıklayabilir.

4.4.2.3. Alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların alfa-glukosidaz önleyici aktiviteleri $405 nm$ dalga boyundaki absorbans değeriyle ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Farklı örneklerde % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerlerinin değişimi. Ok yönünde % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri artmaktadır.

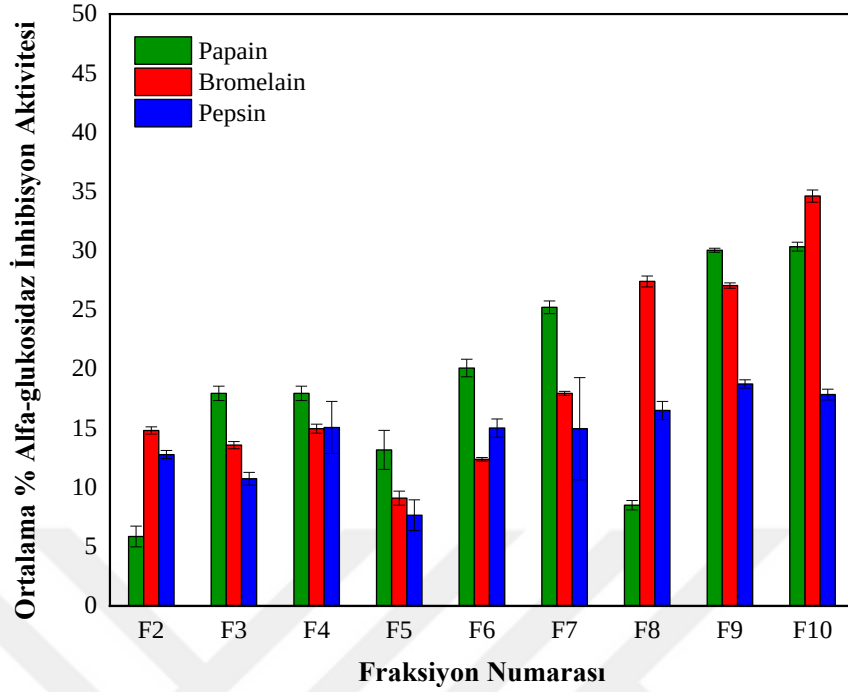
Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim papain olan hidrolizat %20,40±0,1, bromelain olan hidrolizat %14,98±0,1 ve pepsin olan hidrolizat %11,69±0,1 ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite göstermiştir.

Out kısımları ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite açısından, PA out 17,56±0,1, PA out fraksiyonu 18,96±0,1, BR out 12,29±0,1, BR out fraksiyonu 9,15±0,1, PE out 9,70±0,1, PE out fraksiyonu 9,20±0,1 olarak belirlenmiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri Şekil 4.24 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamının değişen oranlarda % alfa-glukosidaz önleyici aktivite sahip olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla BRF10, PAF10 ve PAF9 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC₅₀ değerleri, PAF10 için 0,001 µg/ml ve PAF9 için 0,657 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bitkisel kaynaklı proteinlerden antidiyabetik peptitler belirlemek amacıyla yapılan çalışmada kinoa proteinlerinde (*Chenopodium quinoa* Willd.) IC₅₀ değeri 109,48 µM olan IQAEGGLT peptit sekansına sahip alfa-glukosidaz inhibitör özellikli peptitler tespit edilmiştir (Vilcacundo, Martínez-Villaluenga ve Hernández-Ledesma, 2017).

Alfa-glukosidaz, glikozun disakkaritlerden ayrılmasını katalize eden, ince bağırsağın epitelinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir (Yan vd., 2019). Bu enzimin inhibisyonu, serum glikoz seviyesini düşürmek için etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir (Johnson vd., 2011). İnhibitör mekanizmanın, polipeptidin enzimin aktif bölgesi ile hidrofobik etkileşimleri yoluyla olabileceği öne sürülmüştür (Bharatham vd., 2008). Aktivite gösteren peptitlerin hidrofobik amino asitler, özellikle de alfa-glukozidazı inhibe etmede önemli bir rol oynayabilecek Leu bakımından zengin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.24: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların tamamı ortalama alfa-glukosidaz önleyici aktivite göstermiştir. Fraksiyonlardan en az $5,87 \pm 0,1$ ile PAF2 ve en çok $34,63 \pm 0,1$ ile BRF10 alfa-glukosidaz önleyici aktiviteye sahiptir.

4.4.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların asetilkolinesteraz önleyici aktiviteleri 405 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.25).



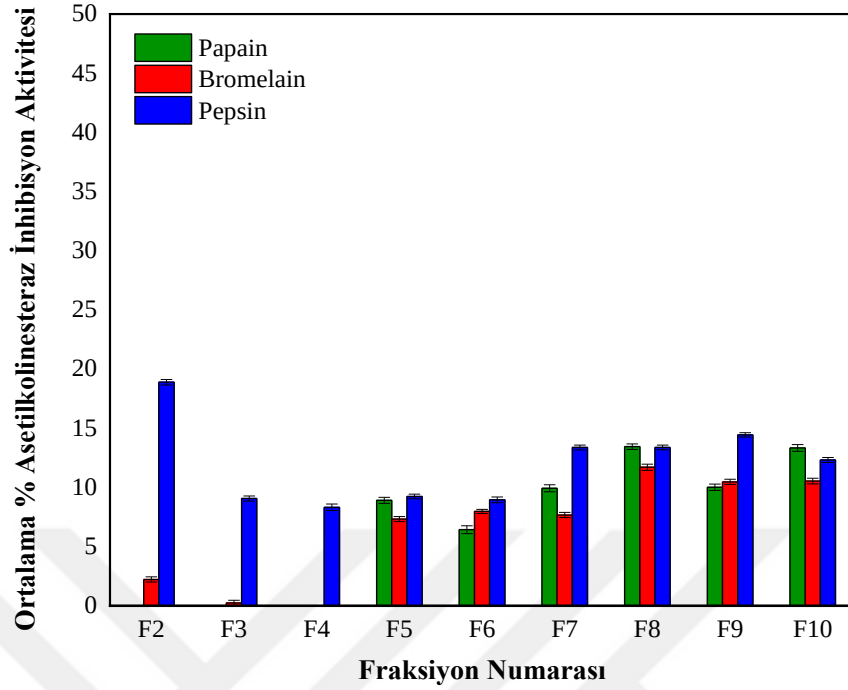
Şekil 4.25: Farklı örneklerde % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerlerinin değişimi. Ok yönünde % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim pepsin olan hidrolizat $12,61 \pm 0,9$ asetilkolinesteraz önleyici aktivite gösterirken, bromelain ve papain olan hidrolizat aktivite göstermemiştir.

Out kısımları ortalama % asetilkolinesteraz önleyici aktivite açısından, BR out $0,35 \pm 0,2$, BR out fraksiyonu $1,78 \pm 0,2$, PE out $9,85 \pm 0,2$, PE out fraksiyonu $11,13 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir. PA out ve fraksiyonu aktivite göstermemiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi değerleri Şekil 4.26 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamı % asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi göstermemektedir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF2, PEF9 ve PAF8 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC_{50} değerleri, PEF2 için $27,22 \mu\text{g/ml}$, PEF9 için $0,14 \mu\text{g/ml}$ ve PAF8 için $3,10 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.26: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi değerleri

Protein hidrolizatları AChE inhibitör peptitlerin kaynakları arasındadır. Ton balığı karaciğeri bir balık yan ürünüdür ve normalde atılır ve/veya balık ve hayvan yemi olarak kullanılır. Ahn, Lee ve Je (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, flavorzim hidrolizinden sonra ticari enzimler alkalaz, nötraz ve protameks tarafından üretilen orkinos balığının fraksiyonlanmış hidrolizatları DPPH radikaline karşı antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca, tüm fraksiyonlanmış hidrolizatlar, asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe etmiştir ve yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonları, düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlarından daha fazla AChE inhibe edici aktivite göstermiştir (Ahn, Lee ve Je, 2010).

Fermente edilmiş soya fasulyesi olan “Douchi”nin AChE inhibitör aktivitesi incelenmiş ve fermantasyonun ardından soya fasulyesi proteininden üretilen biyoaktif peptitlerde AChE inhibisyonu tespit edilmiştir (Liu vd., 2009). Benzer şekilde Chen vd. (2012) tarafından, fermente edilmiş soya peynirinin AChE inhibitör aktivitesi gözlemlenmiştir. Pirinç kepeğinin anti-obezite ve anti-Alzheimer etkilerini inceleyen bir başka çalışmada, aktivite gösteren <5 kDa büyüklüğünde biyoaktif peptitler tanımlanmıştır (Martorell vd., 2013).

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan en yüksek ortalama asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi %18,9±0,2 olan PEF2 fraksiyonudur.

4.4.4. Antioksidatif aktivite testleri

Antioksidan özellikli peptitler, oksidatif stresle mücadeleye yardımcı oldukları için fizyolojik açıdan faydalıdır. Lipit oksidasyonu, depolama ve işleme sırasında gıdanın bozulmasına neden olan, renk, lezzet, doku ve besin profilinde ve potansiyel olarak toksik reaksiyon ürünlerinde istenmeyen değişiklikler üreten ana faktördür, dolayısıyla antioksidan aktivite, ticari ürünlerin depolanmasında önemlidir. Ayrıca, protein yapıda olmayan antioksidanlardan farklı olarak, antioksidan peptitler başka biyoaktiviteler de gösterebilir (Mine, Li-Chan ve Jiang, 2010).

Çalışmada antioksidatif özellikli peptitleri belirlemek amacıyla DPPH yöntemi, demir şelasyon aktivitesi testi, FRAP yöntemi, hidroksil radikali tutma aktivitesi testi, ABTS yöntemi ve süperoksit anyon tutma aktivitesi testi yapılmıştır.

4.4.4.1. DPPH yöntemi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların DPPH süpürme aktivitesi 517 nm dalga boyundaki absorban değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.27).



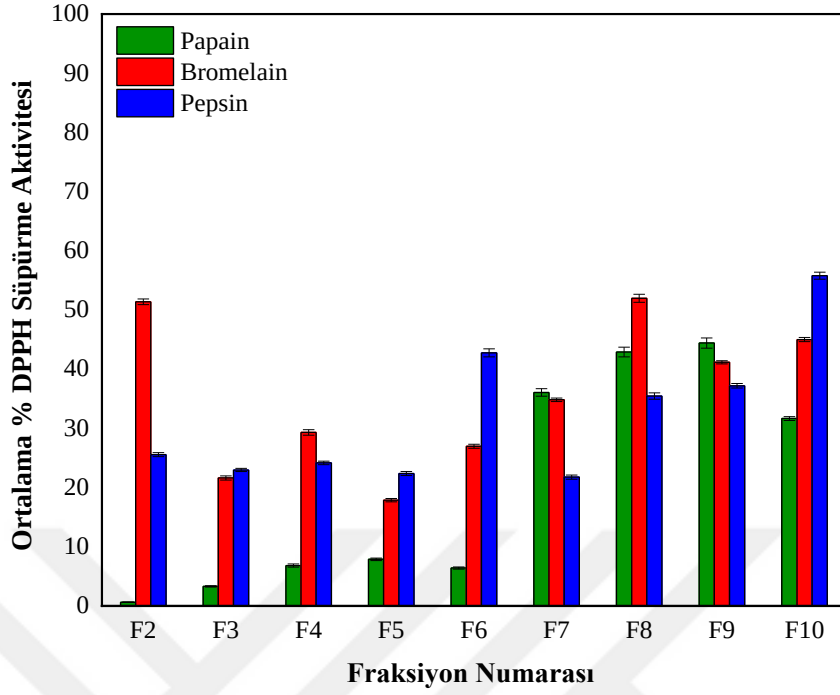
Şekil 4.27: Farklı örneklerde % DPPH süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % DPPH süpürme aktivitesi değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarından papain ile muamele edilen hidrolizat $17,29 \pm 0,4$, bromelain ile muamele edilen hidrolizat $16,14 \pm 0,5$ ve pepsin ile muamele edilen hidrolizat $33,39 \pm 0,3$ ortalama % DPPH süpürme aktivitesi göstermiştir.

Out kısımları ortalama % DPPH süpürme aktivitesi açısından, PA out $6,26 \pm 0,2$, PA out fraksiyonu $1,56 \pm 0,1$, BR out $45,18 \pm 0,5$, BR out fraksiyonu $44,69 \pm 0,7$, PE out $22,04 \pm 0,3$, PE out fraksiyonu $17,54 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri Şekil 4.28 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamının değişen oranlarda % DPPH süpürme aktivitesi olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF10, BRF8 ve BRF2 göstermektedir. Pozitif kontrol olan BHT için IC_{50} değeri $56,96 \mu\text{g/ml}$, troloks için $611,201 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC_{50} değerleri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.28: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % DPPH süpürme aktivitesi değerleri

Çeşitli çalışmalar, peptitlerin antioksidan aktivitesinin moleküler ağırlık dağılımlarına bağlılığını (Peña-Ramos, Xiong ve Arteaga, 2004) ve yüksek derecede hidroliz ve düşük moleküler ağırlığın DPPH radikal süpürme aktivitesi ile korelasyonunu bildirmiştir (Raghavan ve Kristinsson, 2008; Bougatef vd., 2009; Liu vd., 2010; Udenigwe ve Aluko, 2011). Bunun tersine, moleküler ağırlığı <10 kDa olan arpa gluten hidrolizat fraksiyonları, 10 mg/ml konsantrasyonda %61,9'luk DPPH radikal süpürme aktivitesi sergilemiştir; bu, daha yüksek moleküler ağırlığa sahip peptitlerin, daha düşük moleküler ağırlıklı peptitlerden çok daha yüksek DPPH süpürme aktivitesi gösterdiğini düşündürmektedir (Xia vd., 2012).

4.4.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların demir şelasyon aktivitesi Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin oluşumu aracılığıyla 562 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.29).



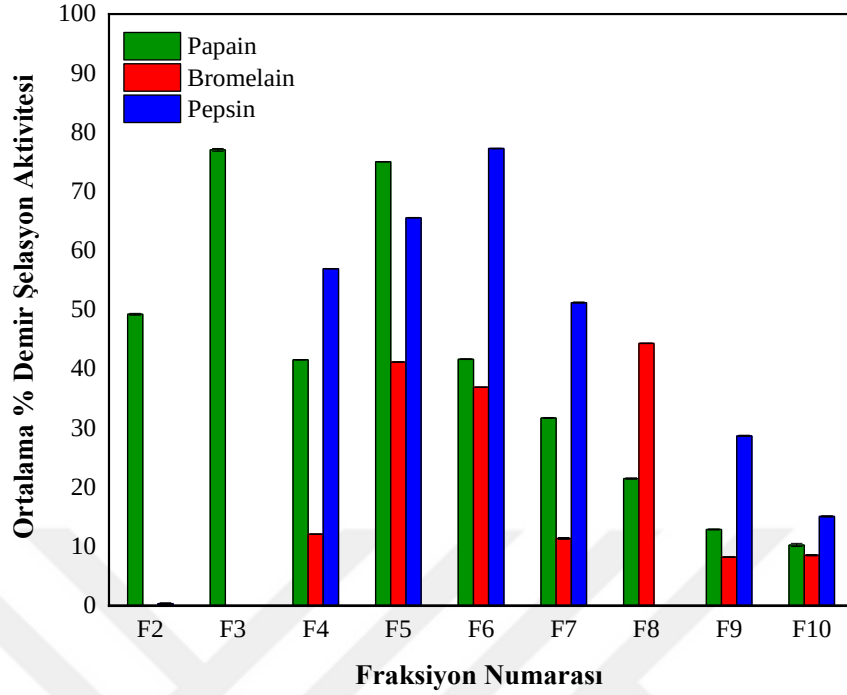
Şekil 4.29: Farklı örneklerde % demir şelasyon aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % demir şelasyon aktivitesi değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % demir şelasyon aktivitesi değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim papain olan hidrolizat %53,18±0,1 demir şelasyon aktivitesi gösterirken, bromelain ve pepsin olan hidrolizat aktivite göstermemiştir.

Out kısımları ortalama % demir şelasyon aktivitesi açısından, PA out 0,13±0,1, PA out fraksiyonu 3,10±0,1, PE out 25,38±0,6 olarak belirlenmiştir. PE out fraksiyonu, BR out ve BR out fraksiyonu aktivite göstermemiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir şelasyon aktivitesi değerleri Şekil 4.30 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamı % demir şelasyon aktivitesi göstermemektedir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF6, PAF3 ve PAF5 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC₅₀ değerleri, PEF6 için 1,96 µg/ml ve PAF3 için 19,40 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olan EDTA için IC₅₀ değeri 61,82 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.30: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir şelasyon aktivitesi değerleri (standart sapma $\leq$ %3)

N- terminalinde yüksek bir His içeriğine ve daha kısa uzunluğa sahip peptitlerin en yüksek metal iyonu şelatlama aktivitesi sergilediği gösterilmiştir (Torres-Fuentes Alaiz ve Vioque, 2011). Mısır gluteni posası ile yapılan çalışmada alkali proteaz, flavorzim, papain ve tripsin kullanılarak DPPH, metal iyon şelatlama ve lipid peroksidasyon inhibisyonu özellikleri incelenmiştir (Zhuang vd., 2013). ALKPROT sekansından üretilen hidrolizatın en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve ana antioksidan peptit amino asit sekansının GHKPS (507,2 Da) olduğu bulunmuştur.

4.4.4.3. FRAP yöntemi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi 700 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Farklı örneklerde % demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi değerleri artmaktadır.

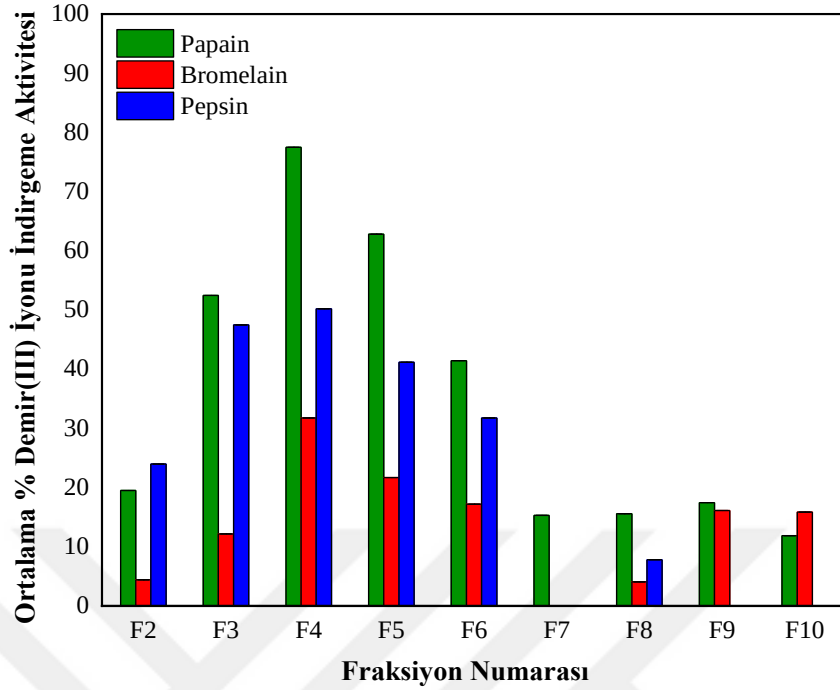
Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim papain olan hidrolizat %75,47±0,1, bromelain olan hidrolizat %53,15±0,1 ve pepsin olan hidrolizat %52,55±0,1 ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite göstermiştir.

Out kısımları ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite açısından, PA out 58,60±0,1, PA out fraksiyonu 69,41±0,1, BR out 12,75±0,1, BR out fraksiyonu 69,52±0,1, PE out 56,16±0,1, PE out fraksiyonu 52,12±0,1 olarak belirlenmiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri Şekil 4.32 üzerinde verilmiştir.

Fraksiyonların tamamı % demir(III) iyonu indirgeyici aktivitesi göstermemektedir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF4, PAF5 ve PAF3 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC₅₀ değerleri, PAF4 için 35,19 µg/ml ve PAF5 için 0 24,91 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olan BHT için IC₅₀ değeri 9,64 µg/ml, troloks için 10,63 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

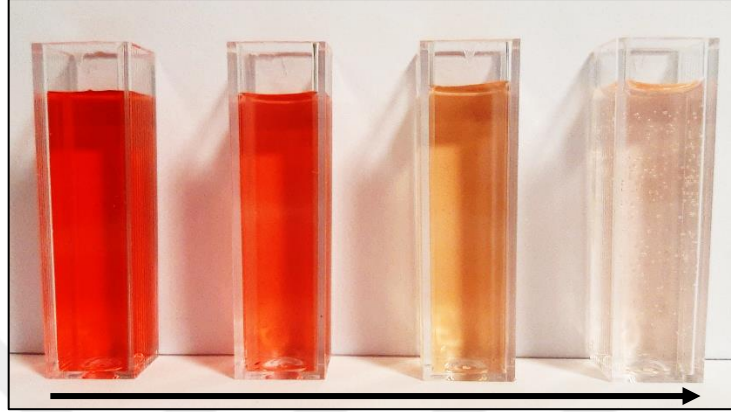


Şekil 4.32: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % demir(III) iyonu indirgeme aktivitesi değerleri (standart sapma ≤ 3)

Bu sonuçlar, bu çalışmada papain, bromelain ve pepsin enzimi ile proteolitik parçalanma yoluyla üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatının ve fraksiyonlarının, bir elektron vericisi olarak işlev görebilen ve daha önceki birkaç çalışma ile uyumlu olarak stabil ürünler oluşturmak için serbest radikallerle reaksiyona girebilen peptitler veya amino asitler içerdiğini göstermektedir (Zhu, Zhou ve Qian., 2006; He vd., 2013). Belirgin bir şekilde, proteinlerin hidrolizi için kullanılan enzimlerin özgülüğündeki farklılıklar, hidrojen veya elektronların verilmesinden sorumlu kalıntının değişen oranlarına sahip peptitlerin oluşumuna yol açabilir. Örneğin, sindirim enzimi pepsin ile üretilen karabuğday proteininin hidrolizatı, indirgeme gücü tayininde olumsuz etkiler sergilerken, pankreatin ve pepsin kombinasyonu ile yapılan hidroliz, aktivitenin geri kazanılmasına yol açmıştır (Ma ve Xiong, 2009). Mikroalg *Palmaria palmata* ile yapılan çalışmada korolaz PP kullanılarak FRAP ve ORAC yöntemleri ile peptitlerin antioksidan özelliklerini incelemiştir (Harnedy, O'Keeffe ve Fitzgerald, 2017). SDITRPGGQM (<1 kDa) peptidi en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir.

4.4.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların hidroksil radikali tutma aktivitesi 532 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.33).

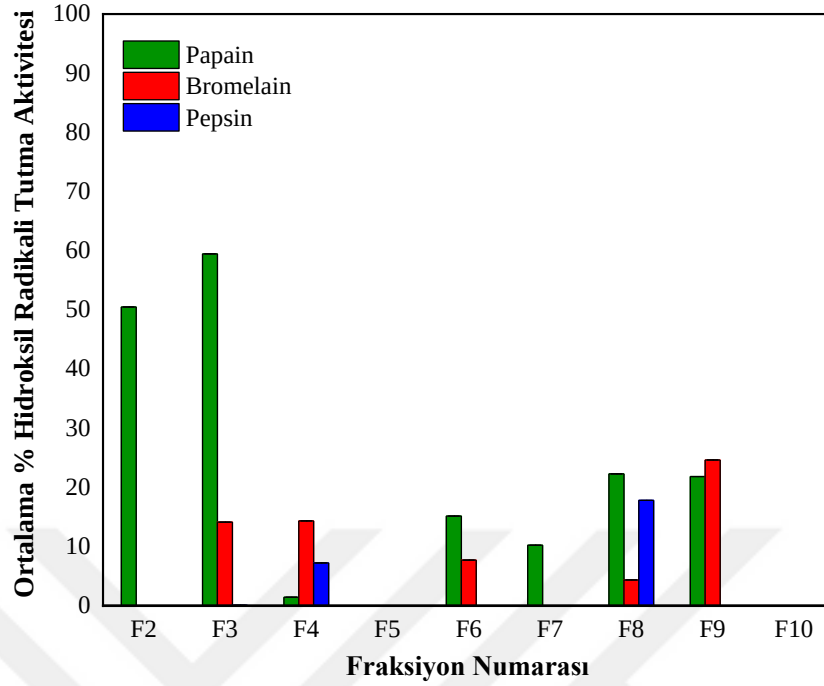


Şekil 4.33: Farklı örneklerde % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatları hidroksil radikali tutma aktivitesi aktivite göstermemiştir.

Out kısımları ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi açısından, PA out $15,09 \pm 0,1$, PA out fraksiyonu $0,93 \pm 0,1$, PE out fraksiyonu $0,84 \pm 0,1$ olarak belirlenmiştir. PE out, BR out ve fraksiyonu aktivite göstermemektedir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri Şekil 4.34 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamı % hidroksil radikali tutma aktivitesi göstermemektedir. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PAF3, PAF2 ve BRF9 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC_{50} değerleri, PAF3 için $6,97 \mu\text{g/ml}$ ve PAF2 için $3,91 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olan BHT için IC_{50} değeri $0,28 \mu\text{g/ml}$, troloks için $0,35 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.34: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri (standart sapma $\leq$ %3)

Udenigwe ve Aluko (2011), peptitlerdeki hidrofobik amino asit kalıntılarının peptitlerin H_2O_2 süpürücü özellikleri üzerinde pozitif etkilere sahip olduğunu, diğer yandan pozitif yüklü kalıntıların bir peptidin hidrojen peroksiti süpürme yeteneğini olumsuz etkilediğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca Li ve Li (2013), bir peptidin C- terminal amino asit kalıntısının, bir peptidin antioksidan aktivitesi için en önemli alan olduğunu göstermiştir.

4.4.4.5. ABTS yöntemi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ABTS süpürme aktivitesi 734 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.35).



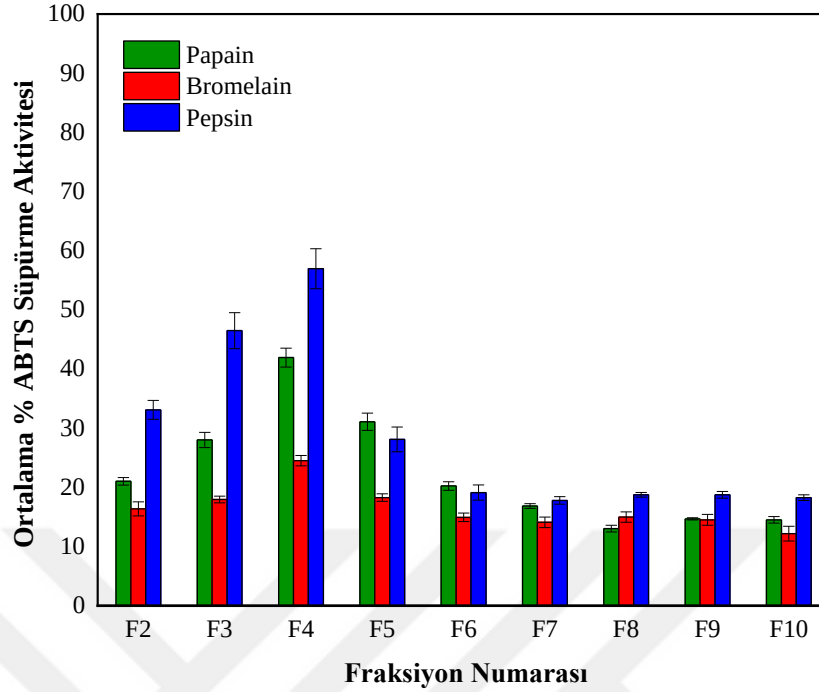
Şekil 4.35: Farklı örneklerde % ABTS süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % ABTS süpürme aktivitesi değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim papain olan hidrolizat %77,57±1,3, bromelain olan hidrolizat %50,21±2,2 ve pepsin olan hidrolizat %80,74±1,1 ortalama % ABTS süpürme aktivitesi göstermiştir.

Out kısımları ortalama % ABTS süpürme aktivitesi açısından, PA out 57,25±2,1, PA out fraksiyonu 46,72±2,2, BR out 19,68±0,9, BR out fraksiyonu 32,49±2,1, PE out 65,08±2,8, PE out fraksiyonu 51,64±3,1 olarak belirlenmiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri Şekil 4.36 üzerinde verilmiştir. Fraksiyonların tamamının değişen oranlarda % ABTS süpürme aktivitesi olduğu görülmüştür. Fraksiyonlardan en yüksek aktiviteyi sırasıyla PEF4, PEF3 ve PAF4 göstermektedir. Aktivitesi yüksek fraksiyonların IC₅₀ değerleri, PEF4 için 80,79 µg/ml, PEF3 için 90,48 µg/ml ve PAF4 için 134,35 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olan BHT için IC₅₀ değeri 23,16 µg/ml, troloks için 26,20 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.36: Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların (F2-F10) ortalama % ABTS süpürme aktivitesi değerleri

Baklagil unu ile yapılan çalışmada alkalaz, pepsin ve tripsin kullanılarak ABTS, linoleik asit otoksidasyonunun inhibisyonu özellikleri incelenmiştir (Arise vd., 2017). Alkalaz ile üretilen peptitler (<1-3 kDa) daha yüksek; hidrolizatlardan elde edilen fraksiyonlar daha düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Mirzapour vd. (2016) yağsız badem unu ile yaptıkları çalışmada alkalaz, kimotripsin, flavorzim, pepsin, tripsin kullanarak ABTS yöntemi ile peptitlerin antioksidan özelliklerini incelemiştir. Alkalaz ile elde edilen hidrolizat (6,5- 14,3 kDa) en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir.

4.4.4.6. Süperoksit anyon tutma aktivitesi testi

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların süperoksit anyon tutma aktivitesi 320 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümüyle belirlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37: Farklı örneklerde % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerlerinin değişimi. Ok yönünde % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerleri artmaktadır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonların ortalama % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerleri hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarından kullanılan enzim papain olan hidrolizat $27,46 \pm 0,2$, bromelain olan hidrolizat $18,63 \pm 0,2$ ve pepsin olan hidrolizat $36,45 \pm 0,2$ ortalama % süperoksit anyon tutma aktivitesi göstermiştir.

Out kısımları ortalama % süperoksit anyon tutma aktivitesi açısından, PA out $23,74 \pm 0,2$, PA out fraksiyonu $12,98 \pm 0,2$, BR out $10,00 \pm 0,2$, BR out fraksiyonu $18,09 \pm 0,2$, PE out $17,46 \pm 0,2$, PE out fraksiyonu $18,74 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir.

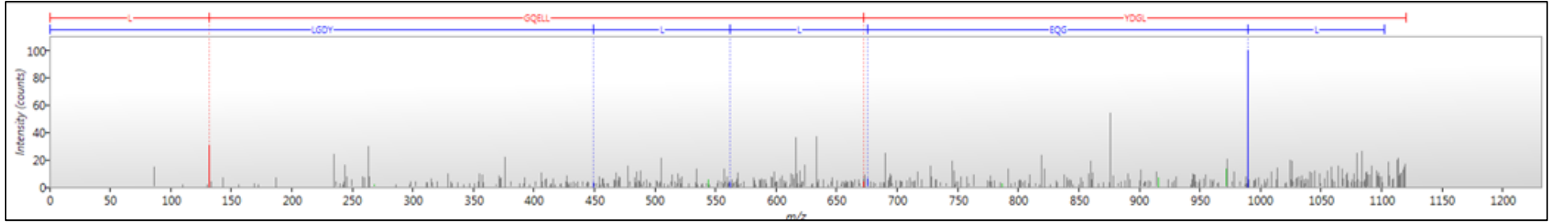
Papain ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan sadece PAF2 fraksiyonu $20,41 \pm 0,2$ % süperoksit anyon tutma aktivitesi göstermiştir. Bromelain ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan BRF2, BRF3, BRF4 fraksiyonu sırasıyla $21,15 \pm 0,2$, $23,69 \pm 0,2$, $0,14 \pm 0,3$ süperoksit anyon tutma aktivitesi göstermiştir. Pepsin ile üretilen fındık proteini hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan PEF2, PEF3, PEF7, PEF8, PEF9 fraksiyonu sırasıyla $24,13 \pm 0,2$, $40,22 \pm 0,6$, $1,53 \pm 0,3$, $3,06 \pm 0,3$, $2,73 \pm 0,3$ süperoksit anyon tutma aktivitesi göstermiştir.

Antioksidan peptitler genellikle 3 ile 6 amino asit uzunluğundadır ve 1 kDa'dan daha düşük bir moleküler kütleye sahiptir (Chen ve Li, 2012). Nohut proteinlerinde en fazla antioksidan özellik gösteren peptitlerin karakterizasyonunda bildirildiği gibi His, Trp, Phe, Pro, Gly, Lys, Ile ve Val gibi hidrofobik amino asit kalıntıları genellikle antioksidan peptitlerde bulunur (Torres-Fuentes vd., 2015). Negatif yüklü Glu ve Asp kalıntıları ayrıca mevcut aşırı elektronlar sayesinde serbest radikalleri gidererek antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Göreceli amino asit pozisyonunun da önemli bir etkisi vardır (Zou vd., 2016). Örneğin, tirozinin yanındaki Glu, tirozinin fenolik hidroksilinin protonunu kaldırarak antioksidan aktiviteyi artırabilir (Piovesana vd., 2018). Komşu kalıntıların antioksidan aktivitesini etkilediği öne sürülen diğer amino asitler arasında, elektron eksikliği olan radikallere hidrojen donörü olarak işlev görebilen Trp ve Cys bulunur. Son olarak, antioksidan peptitlerin tipik örneklerinden olan Pro, His veya Tyr içeren N- terminalinde Val veya Leu durumunda olduğu gibi, belirli pozisyonlar biyoaktivite gösterimi için çok önemlidir. Peptitlerin N- terminalinde ve C- terminalinde Leu ve Ser-Leu/Thr-Leu/Pro-Leu ve C- terminalinde hacimli hidrofobik kalıntılar da antioksidan kapasite belirlemede önemlidir (Zou vd., 2016).

Bitkisel türevli biyoaktif peptitler alanında, soya, mısır, patates ve buğday tohumu proteinlerinin enzimatik hidrolizatlarının potansiyel antioksidan aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Piovesana vd., 2018). Bitki matrislerinde peptit ayrılması, gözlenen biyoaktiviteyi açık bir şekilde değerlendirmek için esastır. Antioksidan aktivite, bu anlamda iyi bir örnektir, izoflavonlar, saponinler ve antioksidan aktivite için aynı biyoaktiviteye sahip protein olmayan bileşenlerin varlığı, tespiti engelleyebilir (Mine, Li-Chan ve Jiang, 2010).

4.5. ACE aktif fraksiyonların LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* yöntemlerle özelliklerinin değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.7'de tarif edildiği üzere ACE aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak uygun LC-Q-TOF/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. Bu bağlamda elde edilen örnek spektrum sunulmaktadır (Şekil 4.38). ACE aktif fraksiyonlarda tespit edilmiş 83 farklı peptid spektrumu bulunduğu için sadece örnek bir gösterim yapılmıştır.



Şekil 4.38: PAF3 fraksiyonuna ait MS spektrumlarından biri, burada örnek olarak sunulmaktadır. Spektrum LGDYLLLEQGL peptidinin iyonizasyonuna karşılık gelmektedir.

LC-Q-TOF/MS analizi sonucunda ilgili veri tabanları ile karşılaştırmalar yapılarak belirlenen numunelerde bulunan peptitlerin dizilimleri (sekansları), moleküler ağırlıkları verilmiştir (Tablo 4.5.1-4.5.8).

Tablo 4.5.1-4.5.8 üzerinden incelenebileceği gibi yapılan analizlerde peptitlerin hiçbirinde toksik etkiler ortaya çıkması beklenmemektedir. Buna ek olarak, bazı alerjen proteinlerin de parçalandığı ve muhtemelen alerjik etkilerinin azalabileceği anlaşılmaktadır. Alerjik olmayan proteinlere ilişkin bazı parçalanmalar da söz konusudur.

Bunun dışında, genellikle out fraksiyonları beklendiği üzere daha yüksek pI değerlerine sahiptir. Yine de bazı istisnalar her iki durum için de söz konusudur. Dolayısıyla, hem out fraksiyonlarda bazik olmayan peptitler görülmüş, hem de sayıca az da olsalar out olmayan fraksiyonlarda bazik peptitler bulunmuştur. Bu peptitlerin bazılarının antimikrobiyal etkiler de dâhil olmak üzere daha sonra incelenecek bazı yenilikçi özelliklerinin olması beklenebilir.

Genel olarak, veri tabanı analizlerinin sonuçlarından da anlaşılabileceği gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, şu aşamada elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulguların bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir. ACE aktif fraksiyonlardan analizi tamamlanmış 83 farklı peptit bulunmaktadır. Bu peptitlerle ilgili değerlendirmeler tablolarda (bromelain, papain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini hidrolizatlarına ait fraksiyonlar) özetlenmiştir. Sayıca bromelain ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan 49, papain ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan 20, pepsin ile üretilen fındık proteini izolatlarının hidrolizatlarına ait fraksiyonlardan 14 adet ACE aktif peptit belirlenmiştir.

Tablo 4.5.1: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
1	BR out	FFFPGPNK	953,21	9,11	0,925382	ACE inhibitor
2	BR out	LSVPNLYVWLCMFY	1748,34	5,84	0,917193	ACE inhibitor
3	BR out	LILVSFSLCLLVLFNGCLG	2024,86	5,82	0,912876	ACE inhibitor
4	BR out	DWWNAK	818,96	6,19	0,812221	DPP-IV inhibitör
5	BR out	FEWVAFK	926,17	6,35	0,739452	ACE inhibitor
6	BR out	NSRFPLAG	861,07	10,11	0,695255	ACE inhibitor
7	BR out	FPCLRNGIPK	1144,54	9,55	0,685234	ACE inhibitor
8	BR out	WMVRHIYFPCLRNG	1792,36	9,55	0,671061	ACE inhibitor
9	BR out	VPHWNLNA	950,18	7,1	0,567019	ACE inhibitor
10	BR out & BRF2	LYVPHWNLNA	1226,55	7,09	0,498095	ACE inhibitor
11	BR out	LQNKFRNSMVG	1293,67	11,01	0,428146	ACE inhibitor
12	BR out	ESSGPINLLHK	1194,52	7,1	0,378602	ACE inhibitor
13	BR out & BRF2	NQLDENPRHFY	1432,67	5,33	0,359851	ACE inhibitor
14	BRF5	QIESWDHNDQQFQCAG	1906,21	4,03	0,337483	ACE inhibitor

Tablo 4.5.2: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerinin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
15	BR out	CIRKSWVVRQLVK	1615,21	11,02	0,33498	ACE inhibitor
16	BR out	FQISREEARRLK	1532,93	10,75	0,333562	ACE inhibitor
17	BRF2	NNVFSGFDA	970,12	3,8	0,318472	ACE inhibitor
18	BR out	TLLVFDEVQCGLG	1393,82	3,67	0,298879	ACE inhibitor
19	BR out	QQQFGQRRRQQHSRG	2025,43	12,48	0,294031	ACE inhibitor
20	BR out	ELLRFGDREFY	1444,76	4,68	0,258676	ACE inhibitor
21	BR out	DSPVVAVSLLHTNNY	1629,02	5,09	0,252972	ACE inhibitor
22	BR out	LPDDVLANA	927,14	3,57	0,245785	ACE inhibitor
23	BR out & BRF2	IRALPDDVLA	1082,4	4,21	0,228586	ACE inhibitor
24	BR out	ILNSLI	671,93	5,88	0,214961	ACE inhibitor
25	BR out	QVLTIPQNFA	1130,46	5,88	0,204557	ACE inhibitor
26	BRF5	EDRRTDFA	1009,13	4,56	0,20263	ACE inhibitor
27	BR out	QVLTIPQNFAVA	1300,7	5,88	0,190895	ACE inhibitor
28	BRF5	MAISDMPESTG	1138,42	3,67	0,186099	ACE inhibitor

Tablo 4.5.3: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
29	BR out	VIRRTIEPNGLLLPQY	1882,49	9,1	0,166933	ACE inhibitor
30	BR out	FQRFTRPDEKQPA	1619,97	9,1	0,166096	ACE inhibitor
31	BR out	TLLVFDEVQCG	1223,57	3,67	0,162137	ACE inhibitor
32	BR out	MINRDENEKLFIVK	1749,27	6,53	0,161584	ACE inhibitor
33	BR out	ILNSLIS	759,02	5,88	0,151496	ACE inhibitor
34	BR out	NSHVREVRGVG	1209,49	9,95	0,145148	ACE inhibitor
35	BRF5	CPETFEDPQQSQQG	1721,99	3,58	0,141302	ACE inhibitor
36	BR out	DSDWLRAVTEQA	1390,63	4,03	0,13593	ACE inhibitor
37	BR out	RVQVLENFTK	1233,58	9,1	0,129468	ACE inhibitor
38	BR out	TNDNAQISPLA	1143,37	3,8	0,127024	ACE inhibitor
39	BR out	VFQDEHFESRVKTEEG	1937,28	4,58	0,119598	ACE inhibitor
40	BR out	CRDERQFDEQRRDG	1938,22	4,87	0,117736	ACE inhibitor
41	BR out	VSLHTNNTYA	1131,4	7,09	0,108661	ACE inhibitor
42	BR out	NAFQISREEA	1164,37	4,54	0,100615	ACE inhibitor

Tablo 4.5.4: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda bromelain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
43	BR out	TLTHVSNV FY	1180,47	7,09	0,0985137	ACE inhibitor
44	BR out	NVEVQAPSSVK	1157,44	6,35	0,0885316	ACE inhibitor
45	BRF2	LEPTNRIEA	1042,28	4,54	0,0861929	ACE inhibitor
46	BR out	TEEGRVQVLENFTK	1650,03	4,79	0,0756939	ACE inhibitor
47	BR out	RVQVVDDNGNTVFDDEL RQG	2276,7	4,04	0,074535	ACE inhibitor
48	BR out	RARVQVVDDNG	1228,48	6,31	0,0647287	ACE inhibitor
49	BR out	NSVRESVRVRDSSTDESLA	2107,47	4,79	0,058533	ACE inhibitor

Tablo 4.5.5: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif findık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
50	PAF3 & PAF4	NSMVGNMIFWFFFCILGQPMCV LLYYHDLNMR	3905,22	7,03	0,925937	ACE inhibitor
51	PA out	SEGFEWVAFK	1199,46	4,54	0,66673	ACE inhibitor
52	PA out	AESEGFEWVAFK	1399,68	4,26	0,497879	ACE inhibitor
53	PAF3	ESPLSSDAIFR	1221,47	4,38	0,466547	ACE inhibitor
54	PA out	QGQQQFGQR	1076,28	10,1	0,422902	ACE inhibitor
55	PAF3	LGDYILLEQGL	1120,43	3,67	0,415663	ACE inhibitor
56	PAF3	DFDEPGHLAPT	1198,4	4,03	0,405327	ACE inhibitor
57	PAF2	MGPTFGAMMISGQK	1455,98	9,11	0,400828	ACE inhibitor
58	PAF2	DENEKLFIVK	1234,56	4,68	0,230645	ACE inhibitor
59	PA out	ADIYTEQVGR	1151,38	4,38	0,222525	ACE inhibitor
60	PA out	STSKDAQALIQSLR	1517,9	9,1	0,215668	ACE inhibitor
61	PAF2	ESFNVEHGDIIR	1415,7	4,66	0,195203	ACE inhibitor
62	PAF2	YNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	2540,18	4,41	0,183816	ACE inhibitor

Tablo 4.5.6: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda papain muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
63	PA out	IQVNKENKEFK	1376,74	8,84	0,177555	ACE inhibitor
64	PA out	INTVNSNTLPVLR	1440,86	10,11	0,163209	ACE inhibitor
65	PA out	RLQSNQDK	988,18	9,1	0,086066	ACE inhibitor
66	PAF4 & PAF5	AISDMPESTGTTATTATMPHGGSD LR	2606,2	4,54	0,0457757	ACE inhibitor
67	PA out	TVDATQSTK	950,13	6,19	0,0405488	ACE inhibitor
68	PA out	NKTTDVAQSAK	1162,41	8,94	0,0404001	ACE inhibitor
69	PAF6	DTDILAAFRVTPQPGVPPEEAGAA VAAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR	4859,97	3,9	0,0072604	ACE inhibitor

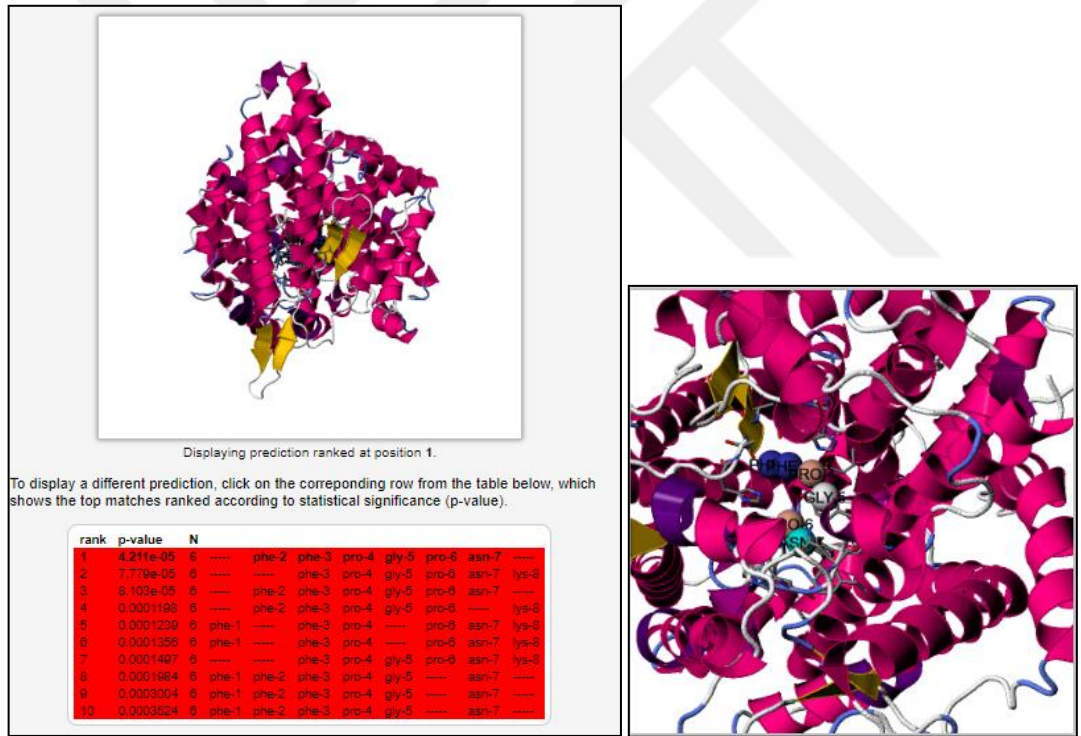
Tablo 4.5.7: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda pepsin muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
70	PEF3 & PEF2	FMRWRDRFL	1326,7	11,7	0,935626	ACE inhibitor
71	PEF2	FEDPQQSQSQGQGQGSQRS EQDRHQKIRY	3603,23	7,11	0,817196	ACE inhibitor
72	PEF2	FEDPQQSQSQGQRQGQGS QRSEQDRHQKIRHFREGDIIA	4763,69	7,27	0,745295	ACE inhibitor
73	PEF2	LDENPRHF	1027,21	5,33	0,581565	ACE inhibitor
74	PEF6 & PEF2	FGGGTLGHP	842,06	7,1	0,562428	ACE inhibitor
75	PEF2	WNLNAHSVV	1039,29	7,1	0,200479	ACE inhibitor
76	PEF2	FAVAKRAESEGFE	1440,74	4,79	0,188218	ACE inhibitor
77	PEF4	FEETICS	827,99	3,8	0,165987	DPP-IV inhibitör
78	PEF2	FTANTSLAH	961,16	7,1	0,153651	ACE inhibitor
79	PEF4	YNDGDSPVAVS	1222,43	3,57	0,116679	ACE inhibitor

Tablo 4.5.8: LC-Q-TOF/MS analizi ve *in silico* analizler sonucunda pepsin muamelesi ile oluşan ACE aktif fındık peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin ve biyoaktif karakteristiklerinin belirlenmesi.

Peptit numarası	Fraksiyon	Sekans	Moleküler Ağırlık (g/mol)	pI	Peptide Ranker	Aktivitesi (BIOPEP)
80	PEF5 & PEF2	SPQTETKASVG	1104,33	6,35	0,0970492	ACE inhibitor
81	PEF2	MSPQTETKASVG	1235,54	6,35	0,0909065	ACE inhibitor
82	PEF2	LNAHSVV	738,94	7,1	0,0776572	ACE inhibitor
83	PEF3	YVKDRVDEVDHTN	1589,86	4,66	0,0499048	ACE inhibitor

Bu değerlendirmeler sonucunda, ACE aktif fraksiyonlarının tamamına yakınında hem aktif hem de aktif olmayan peptitlerin bulunduğu anlaşılmıştır. Mooney vd. (2012) referansına göre peptitlerin muhtemel biyoaktiviteleri (Peptide Ranker) sıralanmıştır. Bunun yanında, Minkiewicz vd. (2008b) referansına göre, peptitlerin (eğer varsa) ACE inhibisyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu bağlamda hem *in vitro* ACE aktivitesi bulgularan, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerin ACE inhibisyon mekanizması incelenmiştir (Trabuco vd., 2012-PepSite2). Bu bağlamda şekiller (Şekil 3.39-3.41) ve tablolarda (Tablo 4.5.9-4.5.11) söz konusu inhibitör peptitlerden her bir enzim için en etkin olanının (en yüksek Peptide Ranker değeri) ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiş ve bu inhibitörlerin ACE'nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği özetlenmiştir.

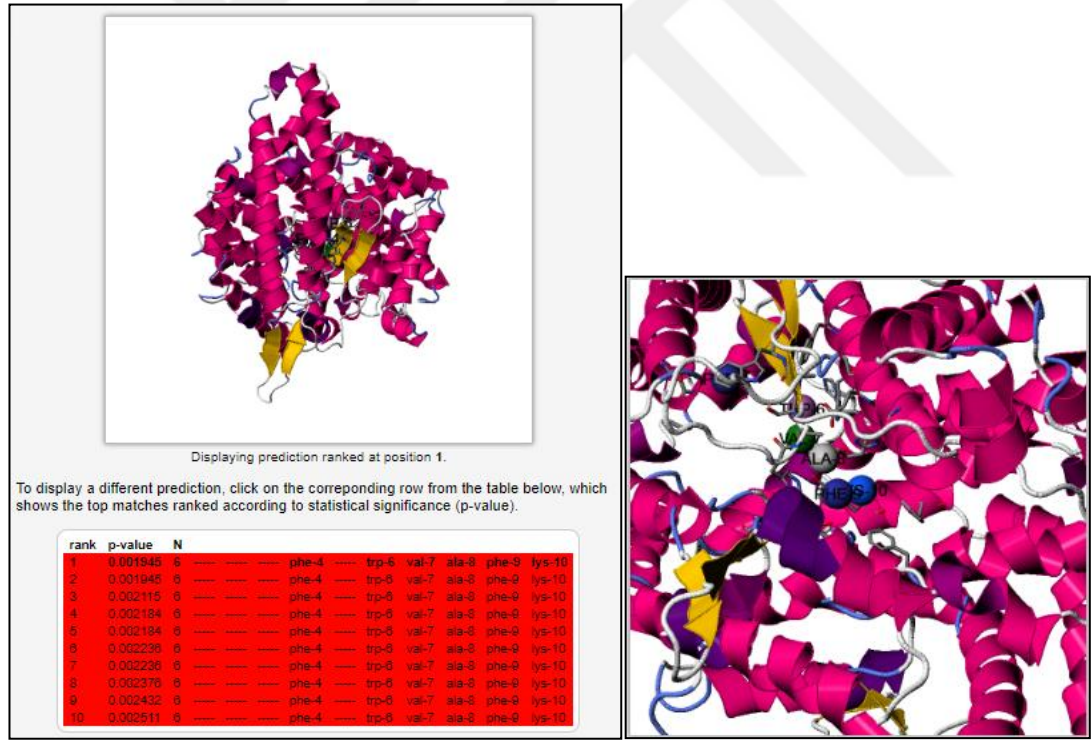


Şekil 4.39: Bromelain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FFFPGPNK peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı %200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Tablo 4.5.9: FFFPGPNK peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanan amino asitler
FFFPGPKNK	Phe-2 Phe-3 Pro-4 Gly-5 Pro-6 Asn-7	4,211E-5	Trp279, Gln281, His353, Ala354, Ser 355, Ala356, His383, Glu384, His 387, Glu411, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 8 amino asitten oluşan FFFPGPNK peptik peptidi, ACE üzerinde 16 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir (Şekil 4.39 ve Tablo 4.5.9) ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1.306 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.

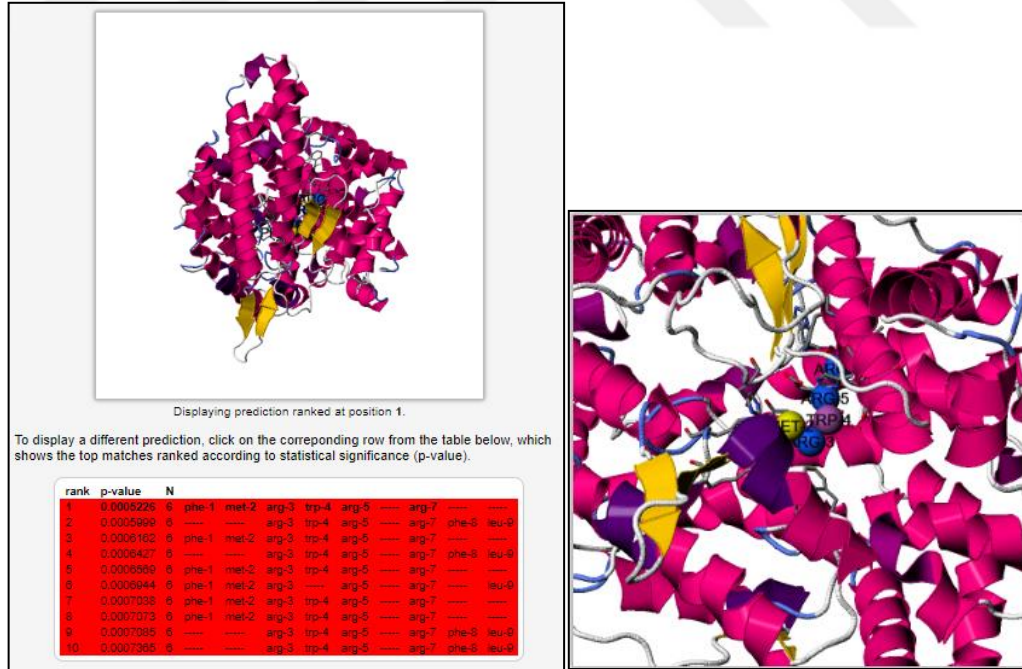


Şekil 4.40: Papain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan kısa peptidin (≤ 10 amino asit, SEGFWEVAFK) ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı %200 büyütme (‘zoom’) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Tablo 4.5.10: SEGFEWVAFK peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanan amino asitler
SEGFEWVAFK	Phe-4 Trp-6 Val-7 Ala-8 Phe-9 Lys-10	0,001945	Asn66, Gln281, His353, Ala354, Ser355, Ala356, Trp357, His383, Glu384, His387, Phe391, His410, Glu411, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Phe527

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 10 amino asitten oluşan SEGFEWVAFK peptidi, ACE üzerinde 18 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir (Şekil 4.40 ve Tablo 4.5.10) ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1.306 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir. Tablo 4.5.9 ile karşılaştırdığımızda bağlantı noktaları benzer olmakla birlikte bu peptidin daha fazla amino asit ile etkileştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.41: Pepsin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FMRWRDRFL peptidinin ACE ile etkileşiminin şematize edilmesi. Solda enzim ve inhibitör birlikte gösterilirken, sağdaki görüntüde etkileşim odaklı %200 büyütme (“zoom”) uygulanmıştır. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Tablo 4.5.11: FMRWRDRFL peptidinin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi. En muhtemel model (Model 1) kullanılmıştır.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanan amino asitler
FMRWRDRFL	Phe-1 Met-2 Arg-3 Trp-4 Arg-5 Arg-7	0,0005226	Gln281, His353, His383, His387, Phe409, His410, Glu411, Ala412, Ile413, Gly414, Asp415, Phe457, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526

Dolayısıyla en muhtemel modele göre 9 amino asitten oluşan FMRWRDRFL triptik peptidi, ACE üzerinde 17 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir (Şekil 4.41 ve Tablo 4.5.11) ve bu sayede inhibisyona sebep olabilmektedir. Modelin etkinliğini göstermek için ACE'nin toplamda 1.306 amino asit uzunluğunda olduğu da belirtilmelidir.

İlk peptit (FFFPGPKNK) ile karşılaştırdığımızda bağlantı noktaları benzer olmakla birlikte bu peptidin daha fazla amino asit ile etkileştiği anlaşılmaktadır. Öte yandan, ikinci peptit (SEGF EWVAFK) ile karşılaştırdığımızda peptitlerin uzunlukları benzer olmakla birlikte ACE üzerinde bağlanan amino asit sayısı FMRWRDRFL için daha yüksektir. Ancak her 3 durumda bağlanan amino asitler genellikle benzerdir.

Tablo 4.5.12'de, pozitif kontrol olarak iyi bilinen bir ACE inhibitörü VPP ile bir kıyaslama yapılmaktadır.

Tablo 4.5.12: Mevcut peptitlerin ACE ile etkileşiminin gerçekleştiği başlıca amino asitlerin listelenmesi ve bu listelerin VPP peptidine ait liste ile kıyaslanması. VPP ile ortak amino asitler kalın karakterlerle gösterilmiştir.

Sekans	Aktif amino asitler	p-değeri	ACE üzerinde bağlanan amino asitler
FFFFGPNK	Phe-2 Phe-3 Pro-4 Gly-5 Pro-6 Asn-7	4,211E-5	Trp279, Gln281, His353, Ala354, Ser 355, Ala356, His383, Glu384, His 387, Glu411, Phe457, Phe460, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523
SEGFVWVAFK	Phe-4 Trp-6 Val-7 Ala-8 Phe-9 Lys-10	0,001945	Asn66, Gln281, His353, Ala354, Ser355, Ala356, Trp357, His383, Glu384, His387, Phe391, His410, Glu411, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Phe527
FMRWRDRFL	Phe-1 Met-2 Arg-3 Trp-4 Arg-5 Arg-7	0,0005226	Gln281, His353, His383, His387, Phe409, His410, Glu411, Ala412, Ile413, Gly414, Asp415, Phe457, Lys511, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526
VPP		2,951E-06	Gln281, His353, His383, His387, His410, Glu411, Ala412, Asp415, Phe457, His513, Tyr520, Tyr523, Ser526, Phe527

Bu durumda VPP peptidinin bağlanabileceği 14 farklı amino asit belirlenmiştir. Bu bağlantı noktalarının tamamı 3 peptit ile ortaktır. Benzerlik dereceleri farklı olmakla birlikte bu peptitlerden en az 1 tanesi söz konusu 14 bağlantı noktasına benzer bir bağlantıya sahiptir. Dolayısıyla bağlantıların hiçbirisi, VPP tripeptidine spesifik değildir. Mevcut ACE aktif fraksiyonlarda bulunan peptitlerin ve henüz dizilimi belirlenememiş diğer peptitlerin analizleri ile ilgili çalışmalar hâlen sürdürülmektedir.

4.6. Gıda uygulamalarının analizleri

Doğal kaynaklardan türetilen peptitlerin ve hidrolizatların işlevselliği ve biyoaktivitesi hakkında çok sayıda bilimsel araştırma yapılmış olmasına rağmen, bulguların çok azı endüstride işlevsel hâle getirilmiştir. Bu durumun nedenleri; işletme ve kurulum maliyetleri, duyuşal endişeler, üreticilerin çekimserliği ve potansiyel yan etkileri konusunda belirsizlik nedeniyle düşük pazar kabul edilebilirliği, yatırım yapılan sermayenin yetersiz getirisi, bazı ülkelerde yasal ve dini kısıtlamalar, ürünlerin yüksek fiyatlı olması sayılabilir. Benzer şekilde, Li-Chan (2015) nutrasötiklerin ve biyoaktif peptit içeren fonksiyonel gıdaların ticarileştirilmesinde birkaç zorluğu şöyle sıralamıştır: (i) kalite güvencesi metodolojisindeki karmaşalar, (ii) biyoyararlanım ve metabolik süreç hakkındaki yetersiz veriler, (iii) fizyolojik etkinin yetersiz klinik kanıtı ve (iv) peptitlerin acılığı. Ek olarak, gıda sistemlerinde antioksidan ajanlar olarak eklendiği düşünüldüğünde, biyoaktif peptitler ve hidrolizatlar birkaç talebi karşılamalıdır; sentetik antioksidanlar ile uygun fiyatlı ve rekabetçi olmalı, insan vücudunda toksisiteye neden olmamalı, düşük konsantrasyonlarda etkili olmalı, işleme operasyonlarını tolere edebilmeli ve hazırlanmış ürünlerde stabil olabilmeli, uygun organoleptik özellikler (tat, koku, renk, görünüş) sunmalıdır (Sila ve Bougatef, 2016).

Çalışmada, fındık proteini ve biyoaktivite gösteren peptitler belirlenen ürünlere ilave edilerek bu ürünlerin sindirim sonrası potansiyel aktiviteleri incelenmiştir.

4.6.1. Ürünlerin fabrika analizleri

FİSKOBİRLİK tesislerinde üretilen ürünlere fabrika olanakları ölçüsünde ve fabrika tarafından belirlenen prosedürlere göre analizler uygulanmıştır.

Duyuşal analizler

Renk analizi Minolta renk tayin cihazı ile yapılmıştır. Fındığa ait “L*” değerinin normal aralıkta olduğu görülmüştür.

Koku ve tat analizi EFİT duyuşal test formuna uygun olarak yapılmıştır. Ürünler tat, koku, görünüm (yüzeyde yağlanma, parçalanma), yapı (sertlik, yumuşaklık), yeme kabiliyeti (ağızda dağılım) gibi özellikleri açısından değerlendirilmiştir.

Değerlendirme sınırlı sayıdaki kişi ile yapıldığından elde edilen veriler değişkenlik gösterebilir.

Kimyasal analizler

Ham madde olan kavrulmuş fıındığın nem oranının %1,8 olması istenir ve bu aralıkta değilse tekrar kavurma işlemi yapılır. Çalışmadaki örneğe ait nem değeri %2,11 olarak bulunmuştur. Örneğe ait asitlik 0,51 olarak bulunmuştur ve bu ideal aralıktadır. Peroksit değeri “0” olarak bulunmuştur. HPLC sisteminde yapılan aflatoksin analizine göre, analiz edilen fındık örneğine ait aflatoksin miktarı prosedürlere uygun aralıkta bulunmuştur.

Mikrobiyolojik analizler

Ham madde olan fıındığa yapılan mikrobiyolojik ekimlerin sonuçları Tablo 4.6.1.1’de verilmiştir. Fabrika prosedürlerine göre analiz edilen fındık örneğine ait mikrobiyolojik ekim sonuçları uygun aralıkta bulunmuştur.

Tablo 4.6.1.1: Mikrobiyolojik ekim sonuçları

Analiz adı	Analiz sonucu (kob/g)	Limit değerler	Metodu	Uygunluk
Toplam bakteri	200	2.000 kob/g	PCA 35°C/48 saat	uygun
Maya-Küf	<10	50 kob/g	YGC Agar 25°C/5-7 gün	uygun
Koliform	-	-	Compact Dry EC 35±2°C/24 saat	uygun
<i>Escherichia coli</i>	-	-	Compact Dry EC 35±2°C/24 saat	uygun
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	Compact Dry SA 35±2°C/24±2 saat	uygun
<i>Salmonella</i> 25g. Da	-	-	Compact Dry SL 35±2°C/24±2 saat	uygun

4.6.2. Ürünlerin alerjenite testleri

Standart ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre örneklerdeki alerjen miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.6.2.1).

%1 fındık proteini izolatu içeren fındık ezmesinde ve %1 BRF10 fraksiyonu içeren fındık ezmesinde yüksek oranda alerjen proteinleri baskılama görülmüştür. %1 PAF4 fraksiyonu içeren fındık ezmesinde %6 gibi bir baskılama varken PEF6 fraksiyonu ilavesi olan fındık ezmesinde herhangi bir baskılama olmamıştır.

Kakaolu fındık kreması ürünlerinde sırasıyla %1 PAF4 fraksiyonu içeren üründe %16, %1 PEF6 fraksiyonu içeren üründe %15, %1 BRF10 içeren üründe %11 civarında alerjen proteinleri baskılama görülmüştür. %1 fındık proteini izolatu içeren kakaolu fındık kreması örneğinde ise herhangi bir baskılama olmamıştır.

Tablo 4.6.2.1: Alerjen testi örnekleri ve alerjen madde miktarı (mg/kg)

Örnek	Fındık alerjeni (mg/kg)	
	Fındık ezmesi	Kakaolu fındık kreması
Blank	567.500	217.000
%1 Fındık proteini izolatu	77,6	226.000
%1 PAF4	529.500	181.500
%1 BRF10	79,12	191.500
%1 PEF6	650.500	184.000

Fındık proteini izolatu ve peptit fraksiyonlarının ürünlere ilavesinin alerjenliği baskılamada büyük bir etkisi görülmemektedir. İki ürün de yoğun şekilde fındık proteinleri içerdiğinden analizi sağlıklı yürütebilmek adına ürünler fazlaca seyreltilmiştir. Bu bağlamda ürünlere farklı oranlarda bileşen ilavesiyle testin tekrarlanması net ve doğru sonuca varmak açısından daha doğru olacaktır.

4.6.3. Ürünlerin biyoaktivite testleri

Ürünlerin biyoaktivite testlerinde, peptit fraksiyonları için uygulanan metotlar uygulanmıştır.

Gıda matrisinin etkisini anlamak için ürünlere eklenen fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 ürünlerdeki oranlarıyla suda hazırlanarak sindirim testleri yapılmıştır. Sindirim testleri sonrası analizler için uygun hâle gelen ürünler ile çalışılmıştır. Gastrointestinal testler sonrası kakaolu fındık kreması ile %16 fındık içeren kakaolu fındık kreması ifade edilirken; gastrointestinal testler sonrası fındık ezmesi ile %70 fındık içeren fındık ezmesi ifade edilmektedir.

4.6.3.1. ACE önleyici aktivite testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan ACE önleyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.1.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan ACE inhibisyon aktivitesi göstermemektedir. PEF6 ve BRF10 fraksiyonu düşük oranda kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünlerinde ACE inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Fındık proteini izolatu ve PAF4 fraksiyonunun hem kakaolu fındık kreması hem de fındık ezmesinde herhangi bir ACE inhibisyon aktivitesi görülmemiştir.

Pozitif kontrol olan Kaptopril fındık ezmesi matrisinde, kakaolu fındık kreması matrisinden daha iyi aktivite göstermiştir. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10, PEF6 fraksiyonu da aynı şekilde aynı oranlardaki kullanımında fındık ezmesinde kakaolu fındık kremasına göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Kakaolu fındık kreması matrisinin ACE önleyici aktivitenin ortaya çıkmasında konçlama aşaması dolayısıyla olumsuz etkisinin olduğu düşünülmektedir. Fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması ürünlerinde eklenen protein izolatu ve fraksiyonların pozitif kontrole yakın değerlerde aktivite göstermesi de yine gıda matrisinden kaynaklanabilir. Ürünlerdeki bileşenler ve üretim prosesindeki aşamalar farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Tablo 4.6.3.1.1: Ürünlerin % ACE inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % ACE İnhibisyon Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	94,85±0,3	91,34±0,2	94,53±0,4
%1 Fındık proteini izolatu	92,78±0,3	90,31±0,2	93,14±0,3
%1 PAF4	92,45±0,2	91,26±0,2	94,21±0,2
%1 BRF10	91,64±0,2	91,39±0,1	94,84±0,4
%1 PEF6	91,20±0,2	91,68±0,2	94,82±0,3
%1 Kaptopril		93,50±0,3	95,26±0,4

4.6.3.2. Antidiyabetik aktivite testleri

4.6.3.2.1. DPP-IV önleyici aktivite testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan DPP-IV önleyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.2.1.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatının, fındık ezmesi ürününde DPP-IV inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu, kakaolu fındık kreması ürününde ise herhangi bir DPP-IV inhibisyon aktivitesine etkisi olmadığı görülmektedir. PAF4 fraksiyonu için blank ürüne bakıldığında fındık ezmesi için %15, kakaolu fındık kreması için %35’lik DPP-IV inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. BRF10 fraksiyonunun kakaolu fındık kreması için %28, fındık ezmesi için %21’lik DPP-IV inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. PEF6 fraksiyonunun kakaolu fındık kreması için %22, fındık ezmesi için %10’luk DPP-IV inhibisyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir.

Tablo 4.6.3.2.1.1: Ürünlerin % DPP-IV inhibisyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % DPP-IV İnhibisyon Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	-	47,83±5,7	38,68±11,3
%1 Fındık proteini izolatu	-	45,26±4,3	70,30±14,3
%1 PAF4	-	82,83±10,2	53,77±6,4
%1 BRF10	-	75,76±2,9	59,55±3,6
%1 PEF6	-	69,98±11,6	48,96±7,3

4.6.3.2.2. Alfa-amilaz önleyici aktivite testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan alfa-amilaz önleyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.2.1.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan alfa-amilaz önleyici aktivite göstermektedir. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ürününde blank ürüne göre sırasıyla yaklaşık %9, %7, %13 ve %44 oranında alfa-amilaz önleyici aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini izolatu ve PAF4 fraksiyonu fındık ezmesi ürününde blank ürüne göre sırasıyla yaklaşık %5 ve %4 oranında alfa-amilaz önleyici aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir.

Tablo 4.6.3.2.2.1: Ürünlerin % alfa-amilaz önleyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Alfa-amilaz Önleyici Aktivite		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	22,23±0,0	21,07±0,1	23,00±0,1
%1 Fındık proteini izolatu	22,20±0,1	30,95±0,0	28,72±0,1
%1 PAF4	20,07±0,1	28,52±0,0	27,20±0,0
%1 BRF10	21,13±0,1	34,90±0,1	20,88±0,1
%1 PEF6	22,97±0,1	65,48±0,0	22,48±0,1

4.6.3.2.3. Alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan alfa-glukosidaz önleyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.2.3.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre BRF10 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan alfa-glukosidaz önleyici aktivite göstermektedir. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürününde alfa-glukosidaz önleyici aktiviteye herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 4.6.3.2.3.1: Ürünlerin % alfa-glukosidaz önleyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Alfa-glukosidaz Önleyici Aktivite		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	31,27±0,0	-	34,18±0,0
%1 Fındık proteini izolatu	16,64±0,0	-	33,06±0,0
%1 PAF4	31,12±0,0	-	25,82±0,0
%1 BRF10	33,06±0,0	-	28,13±0,0
%1 PEF6	25,82±0,1	11,04±0,0	28,13±0,0

4.6.3.3. Asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan asetilkolinesteraz önleyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.3.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan asetilkolinesteraz önleyici aktivite göstermektedir. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ürününde asetilkolinesteraz önleyici aktiviteye herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. PEF6 fraksiyonunun fındık ezmesi için yaklaşık %4’lük bir

asetilkolinesteraz önleyici aktivitesi artışına neden olduğu; fındık proteini izolatu, PAF4 ve BRF10 fraksiyonunun fındık ezmesi ürününde asetilkolinesteraz önleyici aktiviteye herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 4.6.3.3.1: Ürünlerin % asetilkolinesteraz önleyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Asetilkolinesteraz Önleyici Aktivite		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	18,82±0,1	34,53±0,1	17,10±0,1
%1 Fındık proteini izolatu	19,38±0,1	28,45±0,1	7,40±0,4
%1 PAF4	24,31±0,1	29,58±0,1	3,17±0,5
%1 BRF10	30,25±0,1	31,62±0,1	8,83±0,4
%1 PEF6	31,01±0,1	29,38±0,0	21,92±0,1

4.6.3.4. Antioksidatif aktivite testleri

4.6.3.4.1. DPPH yöntemi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan DPPH süpürme aktivitesi testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.4.1.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan DPPH süpürme aktivitesi göstermektedir. Fındık proteini izolatının fındık ezmesi için yaklaşık %0,3’lük DPPH süpürme aktivitesi artışına neden olduğu, kakaolu fındık kreması ürününde ise herhangi bir DPPH süpürme aktivitesine etkisi olmadığı görülmektedir. PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ürününde DPPH süpürme aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının fındık ezmesi ürününde blank ürüne göre sırasıyla yaklaşık %5, %18, %5 oranında DPPH süpürme aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir.

Tablo 4.6.3.4.1.1: Ürünlerin % DPPH süpürme aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % DPPH Süpürme Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	43,23±0,2	54,08±0,2	54,79±0,4
%1 Fındık proteini izolatu	43,61±0,2	49,04±0,2	55,11±0,2
%1 PAF4	37,57±0,1	46,34±0,3	60,32±0,1
%1 BRF10	42,77±0,1	47,28±0,2	72,96±0,7
%1 PEF6	44,88±0,1	47,49±0,2	60,38±0,1

4.6.3.4.2. Demir şelasyon aktivitesi testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan demir şelasyon aktivitesi testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.4.2.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu ve PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan demir şelasyon aktivitesi göstermektedir. Kakaolu fındık kreması matrisinin demir şelasyon aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir. PEF6 fraksiyonu için blank ürüne bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %4, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %41’lik demir şelasyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. PAF4 fraksiyonu için blank ürüne bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %5, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %12’lik demir şelasyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. BRF10 fraksiyonu için blank ürüne bakıldığında fındık ezmesi için yaklaşık %8, kakaolu fındık kreması için yaklaşık %1’lik demir şelasyon aktivitesi artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini izolatının fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması ürününde demir şelasyon aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 4.6.3.4.2.1: Ürünlerin % demir şelasyon aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % Demir Şelasyon Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	61,38±0,0	47,69±0,0	67,08±0,0
%1 Fındık proteini izolatu	68,08±0,0	21,54±0,0	60,31±0,0
%1 PAF4	61,31±0,0	60,46±0,0	72,31±0,0
%1 BRF10	60,38±0,0	49,23±0,0	75,38±0,1
%1 PEF6	82,31±0,0	89,23±0,7	71,54±0,1

4.6.3.4.3. FRAP yöntemi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan demir(III) iyonu indirgeyici aktivite testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.4.3.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan demir(III) iyonu indirgeyici aktivite göstermektedir. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 ve PEF6 fraksiyonlarının kakaolu fındık kreması ürününde blank ürüne göre sırasıyla yaklaşık %4, %4, %2 ve %3 oranında demir(III) iyonu indirgeyici aktivite artışına neden olduğu görülmektedir. Fındık proteini izolatu, PAF4 ve BRF10 fraksiyonlarının fındık ezmesi ürününde blank ürüne göre düşük oranda demir(III) iyonu indirgeyici aktivitesi artışına neden olduğu görülürken PEF6 fraksiyonunun demir(III) iyonu indirgeyici aktiviteye herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir.

Tablo 4.6.3.4.3.1: Ürünlerin % demir(III) iyonu indirgeyici aktivite değerleri

Örnek	Ortalama % Demir(III) İyonu İndirgeme Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	69,58±0,0	84,44±0,0	85,32±0,0
%1 Fındık proteini izolatu	79,63±0,0	88,67±0,0	85,72±0,0
%1 PAF4	73,16±0,0	88,60±0,0	86,35±0,0
%1 BRF10	76,85±0,0	86,94±0,0	86,92±0,0
%1 PEF6	77,13±0,0	87,77±0,0	66,81±0,6

4.6.3.4.4. Hidroksil radikali tutma aktivitesi testi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan hidroksil radikali tutma aktivitesi testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.4.4.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10, PEF6 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan hidroksil radikali tutma aktivitesi göstermemektedir. Fındık ezmesi matrisinin hidroksil radikali tutma aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir. Fındık proteini izolatu ve PAF4 fraksiyonu fındık ezmesi ürününde düşük oranda hidroksil radikali tutma aktivitesi artışına neden olmuştur. Kakaolu fındık kreması ürününde blank ürüne göre herhangi bir hidroksil radikali tutma aktivitesi artışı olmamıştır. Kakaolu fındık kreması ürünündeki aktivite değerlerinin matris olmadan yapılan testler ile benzer sonucu verdiği görülmektedir.

Bu nedenle ürünlerle ilgili sonuçların matris kaynaklı değil, analiz metodunun mekanizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4.6.3.4.1: Ürünlerin % hidroksil radikali tutma aktivitesi değerleri (standart sapma $\leq$ %3)

Örnek	Ortalama % Hidroksil Radikali Tutma Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	62,77	62,05	45,24
%1 Fındık proteini izolatu	60,99	58,19	48,77
%1 PAF4	59,79	59,13	45,93
%1 BRF10	60,06	60,87	39,43
%1 PEF6	57,83	52,47	33,83

4.6.3.4.5. Süperoksit anyon tutma aktivitesi

Gastrointestinal testler sonrası ürünlere yapılan süperoksit anyon tutma aktivitesi testine ait sonuçlar Tablo 4.6.3.4.5.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 fraksiyonu herhangi bir gıda matrisinde olmadan süperoksit anyon tutma aktivitesi göstermektedir. Kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi matrisinin süperoksit anyon tutma aktivitesini azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir. BRF10 ve PEF6 fraksiyonu kakaolu fındık kreması ürününde düşük oranda süperoksit anyon tutma aktivitesi artışına neden olmuştur. Fındık ezmesi ürününde blank ürüne göre herhangi bir süperoksit anyon tutma aktivitesi artışı olmamıştır. Fındık proteini izolatu, PAF4, BRF10 fraksiyonu herhangi bir matris olmadan yapılan testlerdeki aktivitesini fındık ezmesi ve kakaolu fındık kreması matrisinde göstermemiştir.

Tablo 4.6.3.4.5.1: Ürünlerin % süperoksit anyon tutma aktivitesi değerleri

Örnek	Ortalama % Süperoksit Anyon Tutma Aktivitesi		
	Su	Kakaolu fındık kreması	Fındık ezmesi
Blank	78,80 $\pm$ 0,1	73,25 $\pm$ 0,0	75,25 $\pm$ 0,0
%1 Fındık proteini izolatu	79,45 $\pm$ 0,1	72,92 $\pm$ 0,0	74,81 $\pm$ 0,0
%1 PAF4	79,48 $\pm$ 0,1	72,92 $\pm$ 0,0	74,89 $\pm$ 0,0
%1 BRF10	81,39 $\pm$ 0,1	75,52 $\pm$ 0,1	71,20 $\pm$ 0,0
%1 PEF6	76,37 $\pm$ 0,1	75,19 $\pm$ 0,1	71,23 $\pm$ 0,0

Biyoaktif peptitlerin ve hidrolizatların farklı endüstrilerde uygulanmasındaki zorluklar, peptitlerin ve hidrolizatların elde edildiği kaynaklara bağlı olabilmektedir. Harnedy ve FitzGerald (2012) deniz kaynaklı biyoaktif peptitler veya protein hidrolizatları içeren fonksiyonel gıdaların üretiminde ana kaygıları; büyük ölçekli üretim, çeşitli gıda matrisleriyle uyumluluk, gastrointestinal stabilite, biyoyararlanım ve uzun vadeli stabilite olarak tespit etmiştir. Ek olarak, Lafarga ve Hayes (2017) kazein ve peynir altı suyu proteinlerinden, peptitlerin ve hidrolizatların bazı tüketicilerde alerjiye neden olabileceğini belirtmiştir. Korhonen (2009), süttten elde edilen proteinlerin, örneğin kazein ve peynir altı suyunun, biyoaktif peptitler içeren fonksiyonel gıdaların ve nutrasötiklerin en yaygın kaynağı olduğunu ve bununla birlikte, bu kaynaklardan ticari olarak temin edilebilen ürünlerin üretiminin, uygun büyük ölçekli teknolojilerin bulunmaması nedeniyle kısıtlandığını, süt proteinlerinden biyoaktif peptitlerin endüstriyel ve ticari kullanımında teknolojik engellerin üstesinden gelmek için nanofiltrasyon ve ultrafiltrasyon tekniklerinin uygulanabileceğini öne sürmüştür. Grienke, Silke ve Tasdemir (2014), midye etinden uygun biyoaktif peptitleri üretmek ve bunları fonksiyonel gıdalara dâhil etmede süreklilik gösteren bir duruma ulaşmak için akademi ve sanayi arasındaki iş birliğinin gerekliliğine dikkat çekmiştir. Bununla birlikte, kararlılık, acılık ve uygun gıda sınıfı formülasyon prosedürlerinin eksikliği gibi zorlukların laboratuvar beherlerinden endüstriyel ölçeğe geçerken önemli sorunlar olduğunu açıklamışlardır.

Biyoaktif peptitlerin ve hidrolizatların ürünlere uygulanmasında bir başka problem peptitlerin insan sağlığına etkileri üzerine yeterli bilimsel çalışmaların olmamasıdır. Peptitlerin ve hidrolizatların biyoaktivitesini kanıtlayan birkaç *in vivo* araştırma olmasına rağmen, bu çalışmaların sonuçları insan ve hayvan çalışmaları arasındaki uyumsuzluk nedeniyle insanlara güvenle genelleştirilemez. Nongonierma ve FitzGerald (2016a), insan ve hayvan çalışmaları arasındaki tutarsızlığın iki ana nedeni olarak insanlar ve hayvanlar arasındaki biyolojik farklılıklar ve deneysel tasarımdaki farklılıklar olabileceğini ortaya koymuştur (Nongonierma ve FitzGerald, 2016b).

SONUÇ

Bu çalışmada, antihiperhansif, antidiyabetik, antioksidatif özellik gösteren ve insan sağlığına olumlu katkıları olan biyoaktif peptitlerin üretiminde fındık (*Corylus avellana* L.) posası kullanılarak yenilikçi ve yüksek katma değerli peptit ürünlerinin üretilmesi sağlanmıştır. Bu bağlamda endüstriyel yan ürünlerden gıda üretimi, eczacılık ve biyomedikal alanlarda kullanılabilecek son ürünler üretilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, soğuk preslenmiş fındık posasından alkali ekstraksiyonu-izoelektrik çöktürme yöntemiyle fındık proteini izolatları elde edilmiştir. Fındık proteini izolatlarının enzimatik hidrolizinde papain, bromelain ve pepsin enzimleri kullanılmıştır. Hidrolizatları peptitlerin farklı özelliklerine göre gruplandırmak için FPLC sistemi vasıtasıyla iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Zayıf anyonik özellikteki kolon sayesinde, anyonik özellikli peptit fraksiyonları elde edilmiştir.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ve hidrolizatlara ait fraksiyonlara *in vitro* ACE önleyici aktivite testi, antidiyabetik aktivite testleri (DPP-IV önleyici aktivite testi, alfa-amilaz önleyici aktivite testi, alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi), asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi, antioksidatif aktivite testleri (DPPH yöntemi, demir şelasyon aktivitesi testi, FRAP yöntemi, hidroksil radikali tutma aktivitesi testi, ABTS yöntemi, süperoksit anyon tutma aktivitesi) uygulanmıştır.

ACE önleyici aktivite gösteren peptitlerin tanımlanması amacıyla, ACE aktif fraksiyonlarının LC-Q-TOF/MS analizi yapılmış ve *in silico* yöntemlerle özellikleri değerlendirilmiştir. Kütle spektrometresi, kompleks karışımlardaki peptitlerin tanımlanması için kullanıldığında, deneysel spektrumların protein veri tabanlarıyla eşleştirilmesi yaygın yaklaşımlardandır.

ACE önleyici aktivite gösteren peptit fraksiyonları yüksek miktarda toplanarak liyofilize edilmiş ve ürünlerde kullanılmak üzere hazır toz forma getirilmiştir. Üretilen biyoaktif, katma değerli ve alerjik özellikleri baskılanmış peptit fraksiyonları ulusal

bir firma olan FİSKOBİRLİK (Giresun) tesislerinin teknik destek sağlamasıyla firmanın tesislerinde yenilikçi fonksiyonel gıda bileşenleri ve ürünleri üretiminde değerlendirilmiştir. Kakaolu fındık kreması ve fındık ezmesi ürünleri biyoaktif peptitler yönünden zenginleştirilmiş ve ürünlerin duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri firma prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır.

Hazırlanmış ürünlerde fındık proteini kaynaklı alerjik özellikler, ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Aktivitelerin insan vücuduna muhtemel etkilerini daha net ortaya koymak amacıyla, hazırlanmış ürünler simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden geçirilerek sindirilmiş fraksiyonlarda da *in vitro* ACE önleyici aktivite testi, antidiyabetik aktivite testleri (DPP-IV önleyici aktivite testi, alfa-amilaz önleyici aktivite testi, alfa-glukosidaz önleyici aktivite testi), asetilkolinesteraz önleyici aktivite testi, antioksidatif aktivite testleri (DPPH yöntemi, demir şelasyon aktivitesi testi, FRAP yöntemi, hidroksil radikali tutma aktivitesi testi, süperoksit anyon tutma aktivitesi) yapılmıştır.

Papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ve hidrolizatlara ait fraksiyonlara yapılan testlerden *in silico* analizlerle de desteklenen ACE önleyici aktivite testi ve DPP-IV önleyici aktivite testi için değerli bulgular elde edilmiştir.

ACE inhibitör aktivitesi gösteren peptitler, IC₅₀ değeri 4,9E-5 µg/ml (0,22 nM) olarak hesaplanan pozitif kontrol Kaptopril ile karşılaştırılmıştır. Sırasıyla en yüksek % ACE inhibisyon aktivitesi gösteren PAF8, BRF3, PEF3, PEF6 fraksiyonu için IC₅₀ değerleri 6,05 µg/ml, 20,79 µg/ml, 27,42 µg/ml ve IC₅₀ değeri 1,97 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

DPP-IV inhibitör aktivitesi gösteren peptitler, IC₅₀ değeri 9,76 µg/ml (28,59 µM) olarak hesaplanan pozitif kontrol Diprotin A ile karşılaştırılmıştır. Sırasıyla en yüksek % DPP-IV inhibisyon aktivitesi gösteren PAF2, BRF9 fraksiyonu için IC₅₀ değerleri 5,58 µg/ml, 0,07 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Fındık proteini izolatının hidrolizatlarına ve hidrolizatlara ait fraksiyonlara biyoaktif özellikleri saptamak amacıyla uygulanan testlerde farklı fraksiyonlar ve değişen oranlarda olmakla beraber örnekler kısmen testlerin tamamında etkinlik göstermiştir. Üç farklı enzimle elde edilen hidrolizatlardan, en yüksek aktivitenin hidrolizatlara ve out kısmına ait olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, fındık posası yüksek potansiyele

sahip doğal biyoaktif peptit kaynağı olarak değerlendirilebilir. İnhibitör peptitlerin etkileri oldukça ümit verici olmakla birlikte, *in vitro* ve *in silico* verileri doğrulamak için *in vivo* sonrasında bu peptitlerin insanlarda etkinliğini, biyoyararlanımını ve güvenliğini doğrulamak için klinik çalışmalar gereklidir.

Protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması, biyoaktif peptit içeren fonksiyonel gıdalar formüle edilirken bu fraksiyonların bileşen olarak kullanılabilirliğini ve biyoaktivitesini artırma potansiyeli taşımaktadır. Doğru analitik yöntemlerle fraksiyonlama, saflaştırma ve karakterizasyon tekniği, peptidin ayrılması ve tanımlanmasında etkili bir rol oynayabilir. Peptitlerin fraksiyonlanması elüsyon tamponunun tuz konsantrasyonunu artırarak sabit bir pH değerinde gerçekleşmiştir. Bu yöntem, yüksek katyonik veya anyonik peptitlerin fraksiyonlanması için uygundur; bununla birlikte, seçicilikleri düşüktür ve genellikle ayırma için tamamlayıcı bir aşamaya ihtiyaç duyulmaktadır (Wu, Aluko ve Muir, 2009). Bu bağlamda çalışmanın devamında, peptitlerin saflaştırılma aşamasında kombine fraksiyonlama veya saflaştırma yöntemleri uygulanabilir. Özellikle, peptit fraksiyonlarının değişen oranlardaki tuz konsantrasyonu nedeniyle aktivite testlerinde olduğu düşünülen problemleri ortadan kaldırmak için her bir fraksiyona tuzsuzlaştırma aşaması eklenmesi düşünülmektedir. Bununla birlikte, sentetik ilaç moleküllerinden farklı olarak, gıdalardan izole edilen hedef biyoaktif peptitler genellikle çalışmadaki gibi bir peptit karışımıdır. Peptitlerin etkileşimi aktiviteyi artırabilir veya azaltabilir. Bu açıdan, saflaştırma aşamaları sadece verim ve maliyet açısından değil bu sinerjistik etkinin ortadan kalkma ihtimali nedeniyle de iyi tasarlanmalıdır.

ACE inhibisyon aktivitesi gösteren papain, bromelain ve pepsin enzimi ile üretilen fındık proteini hidrolizatlarına ait fraksiyonlar toplanarak uygun LC-Q-TOF/MS analiz teknikleriyle incelenmiştir. ACE aktif fraksiyonlarda 83 farklı peptit spektrumu bulunmuştur. Peptitlerin yapısı ile ACE inhibisyonu arasında bir ilişki vardır. Zincir uzunluğuna, amino asit kompozisyonuna ve sekanslarına bağlı olarak, ACE inhibitör aktivitesi farklı olabilir (Hernández-Ledesma, del Mar Contreras ve Recio, 2011; Aluko, 2015). Hem *in vitro* ACE aktivitesi bulguların, hem de bu aktiviteleri *in silico* tekniklerce doğrulanan peptitlerin ACE inhibisyon mekanizması incelenmiştir. Bu bağlamda, her bir enzim için en etkin olan inhibitör peptitlerin (en yüksek Peptide Ranker değeri) ACE ile etkileşim mekanizması incelenmiştir. Bu inhibitörlerin,

toplamda 1.306 amino asit uzunluğunda olan ACE'nin hangi amino asitleri ile etkileşebileceği değerlendirilmiştir. Bromelain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FFFPGPNK peptidi, ACE ile üzerinde 16 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir. Papain muamelesi ile oluşturulan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan SEGFEWVAFK peptidi, ACE üzerinde 18 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir. Pepsin muamelesi ile hazırlanan peptitler arasında Peptide Ranker değeri en yüksek olan FMRWRDRFL peptidi ACE üzerinde 17 muhtemel bağlanma noktasına sahiptir. Peptitler bu bağlanma noktaları sayesinde inhibisyona sebep olabilmektedir. Her üç durumda bağlanılan amino asitlerin genellikle benzer özellikler sergilediği görülmektedir.

Çalışmada fındık proteinlerinden elde edilen hidrolizatların fraksiyonları alındıktan sonra peptit yapılarını aydınlatmak için LC-Q-TOF/MS sisteminde analizler tamamlanmıştır. Analiz edilen peptit moleküllerinin Uniprot, PLGS, vb. veri bankalarındaki proteinlerle eşleştirilerek peptit moleküllerinin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Fındık posasından elde edilecek başlıca biyoaktif peptitler ve bu peptitlerin ait oldukları proteinler saptanmıştır. Böylelikle ilgili numunelerin biyoaktivliğinin gösterilmesine ek olarak düşük maliyetle endüstriyel yan ürünlerden üretilebilirliği incelenmiştir. Ancak bazı peptit moleküllerinin yapıları bu yolla belirlenememiştir. Genel olarak, veri tabanı analizlerinin sonuçlarından da anlaşılabileceği gibi, bu peptitlerle ilgili bir literatür bulunmamaktadır. Buna ek olarak, şu aşamada elde edilen bazı sinyaller veri tabanlarında olan proteinlerle eşleşmemiştir. Dolayısıyla bulguların bir kısmı yeni protein ve peptit ürünlerine işaret etmektedir. Bu bağlamda, patent başvurusu hazırlığı hâlihazırda devam etmektedir. Bu konu ile ilgili verilerin değerlendirilmesi çalışmaları da benzer şekilde sürdürülmektedir. Çalışmada tespit edilen peptitler tek bir aktiviteye değil çoklu biyoaktif özelliklere sahiptir. Yöntem, *in vitro* testlerdeki sonuçlara istinaden DPP-IV aktif fraksiyonlar, AChE aktif fraksiyonlar, antioksidatif fraksiyonlar için de benzer şekilde uygulanabilir.

Çalışmaların sonunda (*in silico* bulgular da baz alınarak) insan sağlığını olumsuz etkileme potansiyeli olmayan, toksik özellikleri bulunmadığı gibi biyoaktif özellikleri ile birçok endüstriyel üründe kullanılmaya aday bir dizi sıvı konsantre ve liyofilizatın üretilmesi mümkün olmuştur. Yapılan alerji testleri sonucunda ise, alerjik baskılamanın kısmen (bazı durumlarda) gerçekleştiği anlaşılmıştır. Bu numunelerin

analizinde firma olanaklarının elverdiği ve cihazların müsait olduğu ölçüde fizikokimyasal analizler ve mikrobiyolojik testler yürütülmüştür. Sindirilmiş ürünlere yapılan testlerin sonuçları, fraksiyonların kendisine yapılan testlerin sonuçlarıyla benzerlik göstermemiştir. Bunun bir nedeninin, ürünlerin sahip olduğu kompleks gıda matrisinin biyokaktivite gösteren peptitlerle etkileşimi olduğu düşünülmektedir. Ürünlerin fabrika ölçeğindeki üretimine bağlı kalarak tasarlanan laboratuvar ölçekli üretimde proses kaynaklı farklılıklar da sonuçları etkileyebilir. Diğer bir neden, %1 oranında ürünlere ilave edilen bileşenlerin sindirim testleri sonunda toplam sindirilmiş sıvı form içerisindeki konsantrasyonunun düşük olması olabilir. Fındık proteini bileşenlerinin ürüne katılmasındaki potansiyelin daha kapsamlı değerlendirilmesi için hidrolizat ve fraksiyonların teknik fonksiyonel özellik ve reolojik özelliklerinin de değerlendirilmesi yapılmalıdır. Biyoaktif peptitlerin ürünlere ilavesindeki zorluklar gastrointestinal stabilitenin korunması, bu peptitlerin emiliminin genel olarak karmaşık olması, etki mekanizmaları hakkındaki yetersiz bilgiler, potansiyel sağlık iddiaları için önemli kanıtlar sağlayacak uygun klinik çalışmaların eksikliği ve bu ürünlerin piyasadaki yüksek fiyatı şeklinde sayılabilir. Bununla birlikte, biyoaktif peptitlerin gıda sistemlerindeki aktivitesini optimize etmek ve vücutta optimum kullanımını sağlamak için yöntemler geliştirmeye ihtiyaç vardır (Korhonen ve Pihlanto, 2007).

Sonraki çalışmalarda, fındık proteininden enzimatik hidroliz ile üretilen ve fraksiyonlanan biyoaktif peptitlerin tek başına etken madde olarak ilaç, nütresötik alanlarında klinik deneylerle desteklenerek kullanım potansiyeli değerlendirilebilir. Aynı zamanda biyoaktif peptitler ürün zenginleştirmek için fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir. Ayrıca, çalışmadaki biyokaktivite testlerinin sonuçlarına göre katyonik peptitlerin biyoaktif özellikleri üzerine ayrı bir çalışma planlanabilir. Peptit yapısı üzerinde durularak yapı-aktivite incelemesi detaylı şekilde yapılabilir. Çalışma sonuçları, fındık posasının, doğal bir peptit kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak bu ürünlerin gıda ve gıda takviyesi endüstrilerinde ticarileştirilmesine yönelik ön adımların atılmasını sağlamış ve elde edilecek peptitlerin uzun vadede diğer tüketici ürünleri (kozmetik vb.) ile eczacılık ürünleri ve biyomedikal uygulamalarda kullanımının da önü açılmıştır.

KAYNAKÇA

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66, 91-98.
- Adamson, N. J., & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 202-207.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Agrawal, H., Joshi, R., & Gupta, M. (2017). Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides with antioxidant activities from green tender sorghum. *LWT*, 84, 608-616.
- Ahn, C. B., Lee, K. H., & Je, J. Y. (2010). Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 562-568.
- Alaşalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., & Ohshima, T. (2003). Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3790-3796.
- Aluko, R. E. (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 4, 44-50.
- Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: production, isolation, and purification. In *Proteins in Food Processing* (pp. 389-412). Woodhead Publishing.
- Alzheimer's Association. (2014). 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 10(2), e47-e92.

- Alzheimer's Association. (2018). 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 14(3), 367-429.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using alcalase, flavourzyme and thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125-1137.
- AOAC (1990). Meat and Meat Products, Ch. 39, in Official Methods of Analysis. AOAC 15th ed., Association of Official analytical Chemists, Virginia, 931-937.
- AOAC (1998). Ash of seafood. Fish and other marine products. James M. Hungerford, Chapter Editor. In Official Methods of Analysis of AOAC International, Cunniff, P. Eds.; AOAC International: Gaithersburg, Maryland.
- AOAC (2000). Aflatoxin B1 and total aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder—immunoaffinity column liquid chromatography with post-column derivatization. *J AOAC Int.*, 83, 320.
- Arise, A. K., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Malomo, S. A., Aluko, R. E., & Amonsou, E. O. (2017). Inhibitory properties of bambara groundnut protein hydrolysate and peptide fractions against angiotensin-converting enzymes, renin and free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 2834-2841.
- Arise, R. O., Yekeen, A. A., & Ekun, O. E. (2016). *In vitro* antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. *Environ Exp Biol*, 14, 163-172.
- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., & Hartmann, E. M. (2014). Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *Journal of Proteomics*, 105, 5-18.
- Arnold, U., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., & Ulbrich-Hofmann, R. (1996). Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *European Journal of Biochemistry*, 237(3), 862-869.

- Arntfield, S. D., Ismond, M. A. H., & Murray, E. D. (1985). The fate of antinutritional factors during the preparation of a fababean protein isolate using a micellization technique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(2), 137-143.
- Arntfield, S. D., Ismond, M. A. H., & Murray, E. D. (1990). Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. *Thermal Analysis of Foods*, 1990, 51-91.
- Arrutia, F., Binner, E., Williams, P., & Waldron, K. W. (2020). Oilseeds beyond oil: press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology*.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69-82.
- Aydemir, L. Y., Gökbulut, A. A., Baran, Y., & Yemenicioğlu, A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocolloids*, 36, 130-142.
- Ayfer, M., Uzun, A., & Baş, F. (1986). Turkish hazelnut cultivars. *Karadeniz Bölgesi İhracatçıları Birliği, Ankara, Turkey*.
- Babini, E., Tagliazucchi, D., Martini, S., Dei Più, L., & Gianotti, A. (2017). LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chemistry*, 228, 186-196.
- Bains, M., & Hall, E. D. (2012). Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 675-684.
- Balakrishnan, B., Prasad, B., Rai, A. K., Velappan, S. P., Subbanna, M. N., & Narayan, B. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial properties of hydrolysed proteins of delimed tannery fleshings: comparison of acid hydrolysis and fermentation methods. *Biodegradation*, 22(2), 287-295.

- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 317-327.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94-101.
- Başoğlu, F. (2014). *Yemeklik Yağ Teknolojisi*. Dora yayıncılık.
- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneau, M. É. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1(4), 149-157.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry; W. H. New York: *Freeman and Company: New York*.
- Bharatham, K., Bharatham, N., Park, K. H., & Lee, K. W. (2008). Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of α -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26(8), 1202-1212.
- BIOPEP (2021). Bioactive peptides. <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40.
- Boudesocque, L., Lameiras, P., Amarouche, N., Giraud, M., Quattrini, F., Mc Garrity, J., ... & Renault, J. H. (2012). Ion-exchange centrifugal partition chromatography: a methodological approach for peptide separation. *Journal of Chromatography A*, 1236, 115-122.

- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.
- Bouhallab, S., Henry, G., & Boschetti, E. (1996). Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 724(1-2), 137-145.
- Bouvier, E. S., & Koza, S. M. (2014). Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 85-94.
- Boye, J. I., Roufik, S., Pesta, N., & Barbana, C. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 987-991.
- Brady, R., Woonton, B., Gee, M. L., & O'Connor, A. J. (2008). Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 243-248.
- Budseekoad, S., Takahashi Yupanqui, C., Alashi, A. M., Aluko, R. E., & Youravong, W. (2019). Anti-allergic activity of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) protein hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis using non-gastrointestinal and gastrointestinal enzymes. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12674.
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O. N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N. P., & Sánchez-Machado, D. I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112(3), 671-675.
- Cabanillas, B., Pedrosa, M. M., Rodríguez, J., González, Á., Muzquiz, M., Cuadrado, C., ... & Burbano, C. (2010). Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1266-1272.
- Cacciola, F., Dugo, P., & Mondello, L. (2017). Multidimensional liquid chromatography in food analysis. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 96, 116-123.

- Campbell, L., Rempel, C. B., & Wanasundara, J. P. (2016). Canola/rapeseed protein: Future opportunities and directions—Workshop proceedings of IRC 2015.
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art?. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 217-226.
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Piovesana, S., Samperi, R., & Laganà, A. (2013). Proteome investigation of the non-model plant pomegranate (*Punica granatum* L.). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(29), 9301-9309.
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R. Z., & Laganà, A. (2015). Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 205-213.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224-243.
- Castellano, P., Aristoy, M. C., Sentandreu, M. Á., Vignolo, G., & Toldrá, F. (2013). Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne *Lactobacillus*. *Journal of Proteomics*, 89, 183-190.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014.
- Chardigny, J. M., & Walrand, S. (2016). Plant protein for food: opportunities and bottlenecks. *OCL Oilseeds and Fats Crops and Lipids*, 23(4), 6-p.
- Chatterjee, R., Dey, T. K., Ghosh, M., & Dhar, P. (2015). Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 70-81.
- Chen, J., Quan, M. H., Cheng, Y. Q., & Sun, J. (2012). Acetylcholinesterase inhibitory activity of Chinese sufu (fermented tofu) ethanol-extract. *Food Chemistry*, 134(3), 1263-1266.

- Chen, M., & Li, B. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 341-348.
- Chéreau, D., Videcoq, P., Ruffieux, C., Pichon, L., Motte, J. C., Belaid, S., ... & Lopez, M. (2016). Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications. *OCL*, 23(4), D406.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407.
- Cheung, I. W., Nakayama, S., Hsu, M. N., Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by *in silico* and *in vitro* analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9234-9242.
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B., & Wong, J. H. (2015). Marine peptides: bioactivities and applications. *Marine Drugs*, 13(7), 4006-4043.
- Chiang, W. D., Tsou, M. J., Tsai, Z. Y., & Tsai, T. C. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, 98(4), 725-732.
- Cianferoni, A., & Spergel, J. M. (2009). Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International*, 58(4), 457-466.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254-262.
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 67(3), 269-274.
- Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I., & Piot, J. M. (2004). Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. *Biochimie*, 86(1), 31-37.

- Coppey, L. J., Davidson, E. P., Rinehart, T. W., Gellett, J. S., Oltman, C. L., Lund, D. D., & Yorek, M. A. (2006). ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55(2), 341-348.
- Coşkun, Ö., Çakır, B., Vahapoğlu, B., & Gülseren, İ. (2019). Influence of extraction conditions on structural and functional characteristics of black cumin protein concentrates and ACE-inhibition in their hydrolyzates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2328-2338.
- Cotabarren, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García-Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D., & Parisi, M. G. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with papain. *Food Chemistry*, 274, 848-856.
- Cummings, B. J., Pike, C. J., Shankle, R., & Cotman, C. W. (1996). β -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 17(6), 921-933.
- Cunningham, D. F., & O'Connor, B. (1997). Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(2), 160-186.
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
- Da Costa, E. L., Da Rocha Gontijo, J. A., & Netto, F. M. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17(6), 632-640.
- Daien, V., Duny, Y., Ribstein, J., Cailar, G. D., Mimran, A., Villain, M., ... & Fesler, P. (2012). Treatment of hypertension with renin–angiotensin system inhibitors and renal dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hypertension*, 25(1), 126-132.
- De Gobba, C., Tompa, G., & Otte, J. (2014). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205-215.

- De Oliveira, C. F., Corrêa, A. P. F., Coletto, D., Daroit, D. J., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2015). Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2668-2678.
- Demirci, M. (2012). *Gıda Kimyası. İstanbul, Türkiye*.
- Dervişoğlu, M. (2006). Influence of hazelnut flour and skin addition on the physical, chemical and sensory properties of vanilla ice cream. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(6), 657-661.
- Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Physical Therapy*, 88(11), 1254-1264.
- Doğan, G., & Bircan, R. (2010). Balık yemlerinde alternatif bitkisel protein kaynağı olarak fındık küspesi kullanımı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 49-57.
- Dos Santos, S. D. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., & Prentice, C. (2011). Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1399-1406.
- Doyen, A., Husson, E., & Bazinet, L. (2013). Use of an electrodialytic reactor for the simultaneous β -lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1193-1202.
- Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*, 3(3), 153-165.
- Drucker, D. J., & Nauck, M. A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*, 368(9548), 1696-1705.
- Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdigón, G., & Matar, C. (2006). Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211(5), 341-350.
- Dziuba, M., & Dziuba, B. (2010). *In silico* analysis of bioactive peptides. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 325-340.

- Eapen, K. E., Kalbag, S. S., & Subrahmanyam, V. (1966). Key operations in the wet-rendering of peanut for the isolation of protein, oil and starch. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43(10), 585-589.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2009). Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(5), 447.
- Ekezie, F. G. C., Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2018). Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: a review of recent research advances. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 12-25.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654.
- Ertekin-Taner, N., Ronald, J., Feuk, L., Prince, J., Tucker, M., Younkin, L., ... & Younkin, S. G. (2005). Elevated amyloid β protein (A β 42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene. *Human Molecular Genetics*, 14(3), 447-460.
- Espejo-Carpio, F. J., De Gobba, C., Guadix, A., Guadix, E. M., & Otte, J. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal*, 32(2), 175-183.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Siala, R., & Nasri, M. (2013). Wool-waste valorization: production of protein hydrolysate with high antioxidative potential by fermentation with a new keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 424-433.
- Fan, J. B., Zheng, L. H., Wang, F., Guo, H. Y., Jiang, L. U., & Ren, F. Z. (2010). Enzymatic hydrolysis of silk sericin by proteases and antioxidant activities of the hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 34(2), 382-398.

- Fan, J., He, J., Zhuang, Y., & Sun, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. *Molecules*, 17(11), 12836-12850.
- Fan, L., Ren, J., Yang, Y., & Zhang, L. (2020). Comparative analysis on essential nutrient compositions of 23 wild hazelnuts (*Corylus heterophylla*) grown in Northeast China. *Journal of Food Quality*, 2020.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/3/Y5160E/Y5160E00.htm>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organisation of the United Nations. İstatistik veri tabanı. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP/visualize>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- FAOSTAT (2018). Food and Agriculture Organisation of the United Nations. İstatistik veri tabanı. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- FDA (2003). Qualified health claims: Letter of enforcement discretion nuts and coronary heart disease. Docket No 02P-0505. Washington DC: Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/qualified-health-claims-letters-enforcement-discretion>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- Fekete, Á. A., Givens, D. I., & Lovegrove, J. A. (2015). Casein-derived lactotripeptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials. *Nutrients*, 7(1), 659-681.
- Fields, K., Falla, T. J., Rodan, K., & Bush, L. (2009). Bioactive peptides: signaling the future. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8(1), 8-13.
- Fitzgerald, M. A. (2011). Hypertension treatment update: focus on direct renin inhibition. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 23(5), 239-248.
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 33-37.

- Freidinger, R. M. (2003). Design and synthesis of novel bioactive peptides and peptidomimetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(26), 5553-5566.
- Galli, V., Mazzoli, L., Luti, S., Venturi, M., Guerrini, S., Paoli, P., ... & Pazzagli, L. (2018). Effect of selected strains of lactobacilli on the antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 55-65.
- García, M. C., Endermann, J., Gonzalez-Garcia, E., & Marina, M. L. (2015). HPLC-Q-TOF-MS identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (*Prunus cerasus* L.) subproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1514-1520.
- Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4166-4174.
- Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frías, J., Gomez, R., & Martinez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224-232.
- García-Tejedor, A., Sánchez-Rivera, L., Castelló-Ruiz, M., Recio, I., Salom, J. B., & Manzanares, P. (2014). Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: gastrointestinal stability profile and *in vivo* angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1609-1616.
- Garza, N. G. G., Koyoc, J. A. C., Castillo, J. A. T., Zambrano, E. A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & García, S. R. S. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4268-4276.
- GE Healthcare Life Sciences (2010). Strategies for Protein Purification Handbook. <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediafor=matid=10061&destinationid=10016&assetid=15680>, Erişim tarihi: 05/02/2021.

- GE Healthcare Life Sciences (2016). Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods Handbook.
<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediafor=matid=10061&destinationid=10016&assetid=13101>, Erişim tarihi: 05/02/2021.
- Georgiou, H. M., Rice, G. E., & Baker, M. S. (2001). Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins. *PROTEOMICS: International Edition*, 1(12), 1503-1506.
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food Chemistry*, 201, 243-252.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123-131.
- Giresun Ticaret Borsası (2015). Piyasa Analizleri. <http://www.giresuntb.org.tr/images/piyasaanalizi2.pdf>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384-394.
- González-Pérez, S., & Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2173-2191.
- Goyon, A., Beck, A., Colas, O., Sandra, K., Guillaume, D., & Fekete, S. (2017). Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. *Journal of Chromatography A*, 1498, 80-89.

- Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., ... & Kietzmann, T. (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: problems solved?. *Redox Biology*, 6, 372-385.
- Grienke, U., Silke, J., & Tasdemir, D. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chemistry*, 142, 48-60.
- Gu, Y., & Wu, J. (2013). LC–MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, 141(3), 2682-2690.
- Guang, C., & Phillips, R. D. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 137-149.
- Gueguen, J., Walrand, S., & Bourgeois, O. (2016). Plant proteins: context and potentialities for human food. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 51(4), 177-185.
- Guo, L., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., Zhang, L., Li, B., Hou, H., & FitzGerald, R. J. (2015). Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chemistry*, 173, 536-542.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G. P., & Open Source Drug Discovery Consortium. (2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS One*, 8(9), e73957.
- Gülseren, I., & Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(13), 3242-3251.
- Gülseren, İ. (2018). *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2607-2614.

- Gülseren, İ., & Çakır, B. (2019). Preliminary investigations *in vitro* ACE-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *Gıda*, 44(2), 309-317.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215-219.
- Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J., & Morrow, J. A. (2008). Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(7), 1041-1046.
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6-24.
- Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed *Palmaria palmata* protein isolate. *Food Research International*, 100, 416-422.
- Hayes, M. (2014). Bioactive peptides and their potential use for the prevention of diseases associated with Alzheimers’s disease and mental health disorders: food for thought?. *Ann. Psychiatry Ment. Health*, 2, 1017.
- Hayes, M., & Tiwari, B. K. (2015). Bioactive carbohydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22485-22508.
- Hazebrouck, S., Guillon, B., Drumare, M. F., Paty, E., Wal, J. M., & Bernard, H. (2012). Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(4), 548-557.
- He, H. L., Liu, D., & Ma, C. B. (2013). Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 738-749.

- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219-227.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35.
- Hettiarachchy, N. S., Sato, K., Marshall, M. R., & Kannan, A. (Eds.). (2012). *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization*. CRC Press.
- Ho, C. H., Cacace, J. E., & Mazza, G. (2007). Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1637-1647.
- Hong-Qi, Y., Zhi-Kun, S., & Sheng-Di, C. (2012). Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. *Translational Neurodegeneration*, 1(1), 1-12.
- Huang, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., & Hsu, K. C. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, 35(1), 114-121.
- Ialenti, A., Santagada, V., Caliendo, G., Severino, B., Fiorino, F., Maffia, P., ... & Metafora, S. (2001). Synthesis of novel anti-inflammatory peptides derived from the amino-acid sequence of the bioactive protein SV-IV. *European Journal of Biochemistry*, 268(12), 3399-3406.
- International Nut Council and Dried Fruits (2020). Nuts & Dried Fruits Statistical Yearbook 2019/2020. https://www.nutfruit.org/files/tech/1587539172_INC_Statistical_Yearbook_2019-2020.pdf, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Iwaniak, A., & Dziuba, J. (2011). BIOPEP-PBIL tool for the analysis of the structure of biologically active motifs derived from food proteins. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 118-127.

- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
- İslam, A. (2018). Hazelnut cultivation in Turkey. *Academic Journal of Agriculture*, 7(2), 259- 266.
- İslam, A., & Özgüven, A. I. (2000). Clonal selection in the Turkish hazelnut cultivars grown in Ordu province. In *V International Congress on Hazelnut 556* (pp. 203-208).
- Jang, J. H., Jeong, S. C., Kim, J. H., Lee, Y. H., Ju, Y. C., & Lee, J. S. (2011). Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chemistry*, 127(2), 412-418.
- Je, J. Y., Park, P. J., Byun, H. G., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2005). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresource Technology*, 96(14), 1624-1629.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S. B., Mehiri, M., ... & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963-972.
- Jerschow, E., Lin, R. Y., Scaperotti, M. M., & McGinn, A. P. (2014). Fatal anaphylaxis in the United States, 1999-2010: temporal patterns and demographic associations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(6), 1318-1328.
- Jia, C. L., Hussain, N., Ujiroghene, O. J., Pang, X. Y., Zhang, S. W., Lu, J., ... & Lv, J. P. (2020). Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins. *Food Chemistry*, 318, 126333.

- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336-342.
- Jimsheena, V. K., & Gowda, L. R. (2011). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chemistry*, 125(2), 561-569.
- Johnson, M. H., Lucius, A., Meyer, T., & Gonzalez de Mejia, E. (2011). Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8923-8930.
- Jung, W. K., Mendis, E., Je, J. Y., Park, P. J., Son, B. W., Kim, H. C., ... & Kim, S. K. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94(1), 26-32.
- Jung, W. K., Park, P. J., Byun, H. G., Moon, S. H., & Kim, S. K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.
- Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Strati, A., Gardeli, C., Papanikolaou, S., ... & Koutinas, A. A. (2015). Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidants, protein isolate and poly (3-hydroxybutyrate). *Industrial Crops and Products*, 71, 106-113.
- Kadam, D., & Lele, S. S. (2018). Value addition of oilseed meal: a focus on bioactive peptides. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 449-458.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67.

- Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X. M., & Lu, R. R. (2010). Alpha-lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., & Mahedevan, M. (2012). Peptides derived from rice bran protect cells from obesity and Alzheimer's disease. *Int. J. Biomed. Res*, 3, 131-135.
- Karadeniz İhracatçılar Birliği (2019). Türkiye Fındık İhracatı. <http://www.kib.org.tr/files/downloads/2019-ulkeler.pdf>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: a method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 54-60.
- Kašička, V. (2006). Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis*, 27(1), 142-175.
- Kaur, J., Kumar, V., Sharma, K., Kaur, S., Gat, Y., Goyal, A., & Tanwar, B. (2020). Opioid peptides: an overview of functional significance. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 33-41.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, 365(9455), 217-223.
- Kihara, T., & Shimohama, S. (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64(1), 99-106.
- Kim, Y. K., Yoon, S., Yu, D. Y., Lönnerdal, B., & Chung, B. H. (1999). Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research*, 66(3), 431-439.
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y., & Rhee, H. I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21(6), 756-761.

- Kishore, R. (2004). β -Ala containing peptides: potentials in design and construction of bioactive peptides and protein secondary structure mimics. *Current Protein and Peptide Science*, 5(6), 435-455.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829-843.
- Köksal, A. İ., Artik, N., Şimşek, A., & Güneş, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99(3), 509-515.
- Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: type 3 diabetes. *Alternative Medicine Review*, 14(4).
- Kulis, M., MacQueen, I., Li, Y., Guo, R., Zhong, X. P., & Burks, A. W. (2012). Pepsinized cashew proteins are hypoallergenic and immunogenic and provide effective immunotherapy in mice with cashew allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), 716-723.
- Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97-102.
- Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33(3), 217-246.

- Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpé, S., & De Meester, I. (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40(3), 209-294.
- Lammi, C., Bollati, C., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., & Arnoldi, A. (2018). Soybean-and lupin-derived peptides inhibit DPP-IV activity on *in situ* human intestinal Caco-2 cells and *ex vivo* human serum. *Nutrients*, 10(8), 1082.
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., ... & Nasri, M. (2015a). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, 128, 458-468.
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., ... & Nasri, M. (2015b). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 13, 225-238.
- Lee, D. H., Kim, J. H., Park, J. S., Choi, Y. J., & Lee, J. S. (2004). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 25(4), 621-627.
- Lee, S. Y., & Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506-517.
- Leszek, J., Inglot, A. D., Janusz, M., Lisowski, J., Krukowska, K., & Georgiades, J. A. (1999). Colostrinin: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(6), 377-385.
- Levison, P. R. (2003). Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: comparison of different formats. *Journal of Chromatography B*, 790(1-2), 17-33.

- Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H., & Le, G. W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 219-224.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., ... & Aluko, R. E. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9854-9860.
- Li, P., Tang, Y., Liu, L., Wang, D., Zhang, L., & Piao, C. (2019). Therapeutic potential of buckwheat hull flavonoids in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Journal of Functional Foods*, 52, 284-290.
- Li, X. X., Han, L. J., & Chen, L. J. (2008). *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1660-1666.
- Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5681-5690.
- Li, Y. W., & Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29-43.
- Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37.
- Liu, C., Fang, L., Min, W., Liu, J., & Li, H. (2018a). Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Food Chemistry*, 245, 471-480.

- Liu, C., Ren, D., Li, J., Fang, L., Wang, J., Liu, J., & Min, W. (2018b). Cytoprotective effect and purification of novel antioxidant peptides from hazelnut (*C. heterophylla* Fisch) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 42, 203-215.
- Liu, K. (2007). *U.S. Patent Application No. 11/219,277*.
- Liu, M., Du, M., Zhang, Y., Xu, W., Wang, C., Wang, K., & Zhang, L. (2013). Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from walnut protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4097-4100.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2), 403-410.
- Liu, Y., Wang, L., Cheng, Y., Saito, M., Yamaki, K., Qiao, Z., & Li, L. (2009). Isoflavone content and anti-acetylcholinesterase activity in commercial Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 43(4), 301-307.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J. C., & Fine, F. (2012). Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1105-1114.
- López-Fandiño, R., Otte, J., & Van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293.
- Lorey, S., Stöckel-Maschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M. D., ... & Neubert, K. (2003). Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. *European Journal of Biochemistry*, 270(10), 2147-2156.

- Louis, A. M., & Morton, P. (1957). *U.S. Patent No. 2,785,155*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Ma, Y., & Xiong, Y. L. (2009). Antioxidant and bile acid binding activity of buckwheat protein *in vitro* digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4372-4380.
- Maestri, E., Marmiroli, M., & Marmiroli, N. (2016). Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *Journal of Proteomics*, 147, 140-155.
- Majumder, K., & Wu, J. (2010). A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. *Food Research International*, 43(5), 1371-1378.
- Mäkinen, S., Streng, T., Larsen, L. B., Laine, A., & Pihlanto, A. (2016). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antihypertensive properties of potato and rapeseed protein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 25, 160-173.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474.
- Martorell, P., Bataller, E., Llopis, S., Gonzalez, N., Álvarez, B., Montón, F., ... & Genovés, S. (2013). A cocoa peptide protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress and β -amyloid peptide toxicity. *PloS One*, 8(5), e63283.
- Marx, V. (2005). Watching peptide drugs grow up. *Chem. Eng. News*, 83, 17-24.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
- Matsubara, H. (1966). Observations on the specificity of thermolysin with synthetic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 24(3), 427-430.
- Matsui, T., & Tanaka, M. (2010). Antihypertensive peptides and their underlying mechanisms. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*, 1.

- Matsui, T., Li, C. H., & Osajima, Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society*, 5(7), 289-297.
- Maulik, S. K., & Kumar, S. (2012). Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(5), 359-366.
- Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2147-2163.
- Meakin, P. J., Harper, A. J., Hamilton, D. L., Gallagher, J., McNeilly, A. D., Burgess, L. A., ... & Ashford, M. L. (2012). Reduction in BACE1 decreases body weight, protects against diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity in mice. *Biochemical Journal*, 441(1), 285-296.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977.
- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B., & FitzGerald, R. J. (2006). ACE inhibitory peptides. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, 269-315.
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 278-286.
- Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B. (Eds.). (2010). *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* (Vol. 29). John Wiley & Sons.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Darewicz, M., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Nałecz, D. (2008a). Food peptidomics. *Food Technology & Biotechnology*, 46(1).

- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008b). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91(4), 965-980.
- Miralles, B., Amigo, L., & Recio, I. (2018). Critical review and perspectives on food-derived antihypertensive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(36), 9384-9390.
- Mirmiran, P., Bahadoran, Z., & Azizi, F. (2014). Functional foods-based diet as a novel dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications: a review. *World Journal of Diabetes*, 5(3), 267.
- Mirzapour, M., Rezaei, K., Sentandreu, M. A., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2016). *In vitro* antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (*Amygdalus scoparia*) protein by several enzymes. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(3), 609-616.
- Mojica, L., De Mejia, E. G., Menjivar, M., & Granados-Silvestre, M. Á. (2016). Antidiabetic effect of black bean peptides through reduction of glucose absorption and modulation of SGLT1, GLUT2 and DPP-IV in *in vitro* and *in vivo* models. *The FASEB Journal*, 30, 125-6.
- Mojica, L., Luna-Vital, D. A., & González de Mejía, E. (2017). Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2401-2410.
- Mooney, C., Haslam, N. J., Pollastri, G., & Shields, D. C. (2012). Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PloS One*, 7(10), e45012.
- Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., Batista, M. A., e Silva, A. C. S., & Silveira, J. N. (2015). Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme: substrate ratio on peptide profile. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 201-210.

- Moure, A., Sineiro, J., & Domínguez, H. (2001). Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*, 74(3), 327-339.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., ... & Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16(1), 61-69.
- Mundi, S., & Aluko, R. E. (2014). Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin J Nutr Food Sci*, 2(1), 1008-18.
- Mune, M. A. M., Minka, S. R., & Mbome, I. L. (2008). Response surface methodology for optimisation of protein concentrate preparation from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Food Chemistry*, 110(3), 735-741.
- Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodriguez, F., Arana Cuenca, A., & Tellez Jurado, A. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293-317.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773-791.
- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (1999). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, 67(4), 435-443.
- Nagy, K., & Vékey, K. (2008). Separation methods. In: K. Vékey, A. Telekes & A. Vertes (Eds.), *Medical Applications of Mass Spectrometry* (pp. 61–92). Amsterdam: Elsevier.

- Nair, V. P., & Hunter, J. M. (2004). Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 4(5), 164-168.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., & Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78(6), 1253-1257.
- Narayana, J. L., & Chen, J. Y. (2015). Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. *Peptides*, 72, 88-94.
- Nasri, M. (2017). Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 81, 109-159.
- Natesh, R., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551-554.
- Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Datta, G., Garber, D., & Fogelman, A. M. (2004). Human apolipoprotein AI and AI mimetic peptides: potential for atherosclerosis reversal. *Current Opinion in Lipidology*, 15(6), 645-649.
- Ngoh, Y. Y., Lim, T. S., & Gan, C. Y. (2016). Screening and identification of five peptides from pinto bean with inhibitory activities against α -amylase using phage display technique. *Enzyme and Microbial Technology*, 89, 76-84.
- Nitride, C., Picariello, G., Mamone, G., & Ferranti, P. (2017). Proteomics of hazelnut (*Corylus avellana*). In *Proteomics in Food Science* (pp. 107-125). Academic Press.
- NMKL 6. Nitrogen determination in foods and feeds according to Kjeldahl, NMKL method No. 6, Nordic Committee on Food Analysis, 2003, 4th ed.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, 39, 157-163.

- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016a). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 26-43.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016b). Learnings from quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: a review. *RSC Advances*, 6(79), 75400-75413.
- Nongonierma, A. B., Mooney, C., Shields, D. C., & FitzGerald, R. J. (2014). *In silico* approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Peptides*, 57, 43-51.
- Nongonierma, A. B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., & FitzGerald, R. J. (2018). Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 244, 340-348.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2018). Antioxidant properties of flaxseed protein hydrolysates: influence of hydrolytic enzyme concentration and peptide size. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 1105-1118.
- Okay, A.N., Kaya, A., Küçük, V. Y., Küçük, A. 1986. Hazelnut groving. Ministry of Agriculture pubs. 142 pp.
- Olsen, J. V., Ong, S. E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6), 608-614.
- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejia, E. G., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, 76, 839-851.
- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejía, E. G., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., & Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides. *Nutrafoods*, 13(4), 147-157.
- Otağ, F. B., & Hayta, M. (2016). Effects of ultrasound, microwave, fermentation and heat treatments on angiotensin-I converting enzyme activity of chickpea bioactive peptides. *GIDA-Journal of Food*, 41(1), 9-14.

- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., & Nielsen, M. S. (2007). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472.
- Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., & Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46-57.
- Papillo, V. A., Vitaglione, P., Graziani, G., Gokmen, V., & Fogliano, V. (2014). Release of antioxidant capacity from five plant foods during a multistep enzymatic digestion protocol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4119-4126.
- Paredes-López, O., & Ordorica-Falomir, C. (1986). Production of safflower protein isolates: composition, yield and protein quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(11), 1097-1103.
- Parente, E. S., & Wetlaufer, D. B. (1986). Relationship between isocratic and gradient retention times in the high-performance ion-exchange chromatography of proteins: theory and experiment. *Journal of Chromatography A*, 355, 29-40.
- Pelvan, E., Olgun, E. Ö., Karadağ, A., & Alaşalvar, C. (2018). Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin). *Food Chemistry*, 244, 102-108.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L. & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1908-1918.
- Peñas, E., Préstamo, G., Polo, F., & Gomez, R. (2006). Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 99(3), 569-573.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306–1314.

- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., Chiozzi, R. Z., & Laganà, A. (2018). Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3425-3444.
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., & Taverniers, I. (2011). Quantitative detection of hazelnut (*Corylus avellana*) in cookies: ELISA versus real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11395-11402.
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93-104.
- Pripp, A. H., & Ardö, Y. (2007). Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides. *Food Chemistry*, 102(3), 880-888.
- Priyanto, A. D., Doerksen, R. J., Chang, C. I., Sung, W. C., Widjanarko, S. B., Kusnadi, J., ... & Hsu, J. L. (2015). Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins. *Journal of Proteomics*, 128, 424-435.
- Puchalska, P., García, M. C., & Marina, M. L. (2017). Advances in the Determination of Bioactive Peptides in Foods. In: M. V. Aguilar & C. Otero (Eds.), *Frontiers in Bioactive Compounds* (Vol. 2, pp. 24–53). Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers.
- Qu, W., Ma, H., Jia, J., He, R., Luo, L., & Pan, Z. (2012). Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 1021-1026.
- Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1434-1441.

- Raikos, V., & Dassios, T. (2014). Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(2), 91-101.
- Rajesh, B. M., & Iqbal, J. (2006). Recent advances in the synthesis of some bioactive peptides and peptidomimetics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(4), 247-259.
- Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L., & Moresoli, C. (2013). Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 429, 81-87.
- RCSB Protein Data Bank (2020). Crystal Structure of Human Angiotensin Converting Enzyme in complex with lisinopril. <https://www.rcsb.org/structure/1O86>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rees, T. M., & Brimijoin, S. (2003). The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc)*, 39(1), 75-83.
- Riascos, J. J., Weissinger, S. M., Weissinger, A. K., Kulis, M., Burks, A. W., & Pons, L. (2016). The seed biotinylated protein of soybean (*Glycine max*): a boiling-resistant new allergen (Gly m 7) with the capacity to induce IgE-mediated allergic responses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(19), 3890-3900.
- Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G. S., Saa, D. L. T., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549-569.
- Roberts, P. R., Burney, J. D., Black, K. W., & Zaloga, G. P. (1999). Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60(4), 332-337.

- Rocklin, R. D., Pohl, C. A., & Schibler, J. A. (1987). Gradient elution in ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 411, 107-119.
- Rodrigues, I. M., Coelho, J. F., & Carvalho, M. G. V. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 337-346.
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., ... & Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 638-646.
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6(1), 12-19.
- Rosenblum, J. S., & Kozarich, J. W. (2003). Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(4), 496-504.
- Rutherford-Markwick, K. J. (2012). Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S149-S157.
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. B. (2014). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65, 453-461.
- Saladino, R., Botta, G., & Crucianelli, M. (2012). Advances in the synthesis of bioactive unnatural amino acids and peptides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(4), 277-300.
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: a review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
- Scarborough, P., Appleby, P. N., Mizdrak, A., Briggs, A. D., Travis, R. C., Bradbury, K. E., & Key, T. J. (2014). Dietary greenhouse gas emissions of meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans in the UK. *Climatic Change*, 125(2), 179-192.

- Schechter, I., & Berger, A. (1968). On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 32(5), 898-902.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Shahidi, F., Alaşalvar, C., & Liyana-Pathirana, C. M. (2007). Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1212-1220.
- Sharma, G. M., Su, M., Joshi, A. U., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2010). Functional properties of select edible oilseed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5457-5464.
- Sheih, I. C., Fang, T. J., & Wu, T. K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 115(1), 279-284.
- Shi, A., Liu, H., Liu, L., Hu, H., Wang, Q., & Adhikari, B. (2014). Isolation, purification and molecular mechanism of a peanut protein-derived ACE-inhibitory peptide. *PloS One*, 9(10), e111188.
- Shriver, S. K., & Yang, W. W. (2011). Thermal and nonthermal methods for food allergen control. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 26-43.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291-307.
- Sila, A., & 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.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101(4), 1484-1491.
- Siow, H. L., & Gan, C. Y. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141(4), 3435-3442.

- Siow, H. L., Lim, T. S., & Gan, C. Y. (2017). Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated bioinformatics-phage display approach: case study–cumin seed. *Food Chemistry*, 214, 67-76.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Nurminen, M. L. (2002). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *The Journal of Dairy Research*, 69(1), 103.
- Smacchi, E., & Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17(2), 129-141.
- Sornwatana, T., Bangphoomi, K., Roytrakul, S., Wetprasit, N., Choowongkamon, K., & Ratanapo, S. (2015). Chebulin: *Terminalia chebula* Retz. fruit-derived peptide with angiotensin-I–converting enzyme inhibitory activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(6), 746-753.
- Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., & Corvol, P. (1988). Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9386-9390.
- Stokes, J., Kannel, W. B., Wolf, P. A., D'Agostino, R. B., & Cupples, L. A. (1989). Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease. The framingham study--30 years of follow-up. *Hypertension*, 13(5_supplement), I13.
- Su, G., Zhao, T., Zhao, Y., Sun-Waterhouse, D., Qiu, C., Huang, P., & Zhao, M. (2016). Effect of anchovy (*Coilia mystus*) protein hydrolysate and its Maillard reaction product on combating memory-impairment in mice. *Food Research International*, 82, 112-120.
- Su, R., Liang, M., Qi, W., Liu, R., Yuan, S., & He, Z. (2012). Pancreatic hydrolysis of bovine casein: peptide release and time-dependent reaction behavior. *Food Chemistry*, 133(3), 851-858.
- Suetsuna, K., & Chen, J. R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Marine Biotechnology*, 3(4), 305-309.

- Sun, X., Chakrabarti, S., Fang, J., Yin, Y., & Wu, J. (2016). Low-molecular-weight fractions of alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor κ B pathway. *Nutrition Research*, 36(7), 648-657.
- Sung, D. E., Lee, J., Han, Y., Shon, D. H., Ahn, K., Oh, S., & Do, J. R. (2014a). Effects of enzymatic hydrolysis of buckwheat protein on antigenicity and allergenicity. *Nutrition Research and Practice*, 8(3), 278.
- Sung, D., Ahn, K. M., Lim, S. Y., & Oh, S. (2014b). Allergenicity of an enzymatic hydrolysate of soybean 2S protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2482-2487.
- T.C. Ticaret Bakanlığı Esnaf, Sanatkârlar ve Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü. (2020). 2019 Yılı Fındık Raporu. <https://esnafkoop.ticaret.gov.tr/data/5d44168e13b876433065544f/2019%20%20F%C4%B1nd%C4%B1k%20Raporu.pdf>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Taga, Y., Hayashida, O., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K., & Hattori, S. (2017). Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger protease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(9), 1823-1828.
- Tatar, F., Tunç, M. T., & Kahyaoğlu, T. (2015). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1024-1031.
- Tavares, T. G., Contreras, M. M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P. J., Pintado, M. E., Recio, I., & Malcata, F. X. (2011). Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21(12), 926-933.
- Tenenbaum, A., Grossman, E., Shemesh, J., Fisman, E. Z., Nosrati, I., & Motro, M. (2000). Intermediate but not low doses of aspirin can suppress angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough. *American Journal of Hypertension*, 13(7), 776-782.

- Thewissen, B. G., Pauly, A., Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chemistry*, 127(4), 1653-1658.
- Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., & Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 11(8), 947-959.
- Thompson, M. M. (1982). Breeding for filbert varieties suitable for shelling. In *Proceedings-Nut Growers Society of Oregon, Washington and British Columbia (USA)*.
- Thompson, T., Kane, R. R., & Hager, M. H. (2006). Food allergen labeling and consumer protection act of 2004 in effect. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 106(11), 1742-1744.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
- Toopcham, T., Mes, J. J., Wichers, H. J., Roytrakul, S., & Yongsawatdigul, J. (2017). Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins. *Food Chemistry*, 220, 190-197.
- Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü (2019). 2018 Yılı Fındık Sektör Raporu. <https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/findiksektorraporu2018.pdf>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129(2), 485-490.
- Torres-Fuentes, C., Del Mar Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202.
- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Becerra, L., & Lugo-Cervantes, E. (2017). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed. *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 489-496.

- Trabuco, L. G., Lise, S., Petsalaki, E., & Russell, R. B. (2012). PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W423-W427.
- Tran, S., Retnakaran, R., Zinman, B., & Kramer, C. K. (2018). Efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the management of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20, 68-76.
- TS 323 (2003). Fındık küspesi. https://www.tb.org.tr/uploads/files/3370-F%C4%B1nd%C4%B1k_K%C3%BCspesi.pdf, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- TS EN ISO 3960 (2017). Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar-Peroksit değeri tayini-İyodometrik (görsel) son nokta tayini. <https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055048065082077055103076076056084106106071105054097069122110105111049121073110073120098047105090113083111075101056099111088047051111084069102070100076097101073047121113075108070074075072117078057073110055083117069103069088106072083057112073110114066056097118047111090048083089082105083053118076066101105109049113105112117103111089070099084109050075066081088072108105057079109084051047098075104119084120110043114122067103061061>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- TS EN ISO 660 (2020). Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar-Asit sayısı ve asitlik tayini. <https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073102055083081074070071074043056054>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Tulipano, G., Faggi, L., Nardone, A., Cocchi, D., & Caroli, A. M. (2015). Characterisation of the potential of β -lactoglobulin and α -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: *in silico* and *in vitro* comparative studies. *International Dairy Journal*, 48, 66-72.
- Turan, A., & İslam, A. (2018). Effect of drying methods on some chemical characteristics of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during storage. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(3), 11-19.

- Turan, D., Altay, F., & Güven, E. Ç. (2015). The influence of thermal processing on emulsion properties of defatted hazelnut flour. *Food Chemistry*, 167, 100-106.
- Türk Gıda Kodeksi (2011). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2016). Dış Ticaret Endeksleri, Kasım 2016. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Dis-Ticaret-Endeksleri-Kasim-2016-2483>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2020). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3148-3161.
- Udenigwe, C. C., & Mohan, A. (2014). Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *Journal of Functional Foods*, 8, 45-52.
- Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Doyen, A., Li, H., Bazinet, L., & Aluko, R. E. (2012). Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chemistry*, 132(1), 468-475.
- Udenigwe, C. C., Gong, M., & Wu, S. (2013). *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry*, 48(11), 1794-1799.
- Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (2020). “Fındık iç, beyazlatılmış”. <http://www.turkomp.gov.tr/food-findik-ic-beyazlatilmis-407>, Erişim tarihi: 07/02/2021.

- United States Department of Agriculture (2018). World Agricultural Production. <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/5q47rn72z/qj72pc12b/sj1395841/production.pdf>, Erişim tarihi: 07/02/2021.
- Ustunol, Z. (Ed.). (2015). *Applied Food Protein Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Van Boxtel, E. L., Van Den Broek, L. A., Koppelman, S. J., & Gruppen, H. (2008). Legumin allergens from peanuts and soybeans: effects of denaturation and aggregation on allergenicity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(6), 674-682.
- Van Der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B., & Voragen, A. G. (2002). Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 12(10), 813-820.
- Van Dorpe, S., Bronselaer, A., Nielandt, J., Stalmans, S., Wynendaele, E., Audenaert, K., ... & De Spiegeleer, B. (2012). Brainpeps: the blood–brain barrier peptide database. *Brain Structure and Function*, 217(3), 687-718.
- Van Lancker, F., Adams, A., & De Kimpe, N. (2011). Chemical modifications of peptides and their impact on food properties. *Chemical Reviews*, 111(12), 7876-7903.
- Velickovic, T. C., Ognjenovic, J., & Mihajlovic, L. (2012). Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins by Ion Exchange Chromatography. In *Ion exchange technology II* (pp. 1–34). Dordrecht: Springer, Netherlands.
- Verbon, E. H., Post, J. A., & Boonstra, J. (2012). The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 511(1), 1-6.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357-366.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531-539.

- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, 15(1-2), 40-56.
- Wang, B. S., Wang, H., Wei, Z. H., Song, Y. Y., Zhang, L., & Chen, H. Z. (2009). Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine a in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *Journal of Neural Transmission*, 116(4), 457-465.
- Wang, F., Zhou, X. L., Yang, Q. G., Xu, W. H., Wang, F., Chen, Y. P., & Chen, G. H. (2011). A peptide that binds specifically to the β -amyloid of Alzheimer's disease: selection and assessment of anti- β -amyloid neurotoxic effects. *PLoS One*, 6(11), e27649.
- Wang, L., Ding, L., Xue, C., Ma, S., Du, Z., Zhang, T., & Liu, J. (2018). Corn gluten hydrolysate regulates the expressions of antioxidant defense and ROS metabolism relevant genes in H₂O₂-induced HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 42, 362-370.
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., & Li, P. (2017). Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International*, 2017.
- Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. S., & Stevens, J. F. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*, 192, 156-162.
- White, B. L., Sanders, T. H., & Davis, J. P. (2014). Potential ACE-inhibitory activity and nanoLC-MS/MS sequencing of peptides derived from aflatoxin contaminated peanut meal. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 537-542.
- Wijesekara, I., & Kim, S. K. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs*, 8(4), 1080-1093.
- Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B., & International, A. D. (2013). The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 1-11.

- Wimo, A., Winblad, B., & Jönsson, L. (2007). An estimate of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. *Alzheimer's & Dementia*, 3(2), 81-91.
- Wisniewski, H. M., Sadowski, M., Jakubowska-Sadowska, K., Tarnawski, M., & Wegiel, J. (1998). Diffuse, lake-like amyloid- β deposits in the paraventricular layer of the presubiculum in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57(7), 674-683.
- World Health Organization (2015). Obesity and Overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- World Health Organization (2016). Global Report on Diabetes. <https://www.who.int/publications/i/item/who-nmh-nvi-16.3>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- World Health Organization (2020). Cardiovascular Diseases (CVDs). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>, Erişim tarihi: 06/02/2021.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Muir, A. D. (2008). Purification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of defatted canola meal. *Food Chemistry*, 111(4), 942-950.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Muir, A. D. (2009). Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal. *Bioresource Technology*, 100(21), 5283-5287.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732-738.
- Wu, J., Huo, J., Huang, M., Zhao, M., Luo, X., & Sun, B. (2017). Structural characterization of a tetrapeptide from sesame flavor-type Baijiu and its preventive effects against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10495-10504.

- Wu, S., Qi, W., Su, R., Li, T., Lu, D., & He, Z. (2014). CoMFA and CoMSIA analysis of ACE-inhibitory, antimicrobial and bitter-tasting peptides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 100-106.
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M. & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134, 1509-1518.
- Xie, N., Huang, J., Li, B., Cheng, J., Wang, Z., Yin, J., & Yan, X. (2015). Affinity purification and characterisation of zinc chelating peptides from rapeseed protein hydrolysates: possible contribution of characteristic amino acid residues. *Food Chemistry*, 173, 210-217.
- Yağcı, S., & Göğüş, F. (2008). Response surface methodology for evaluation of physical and functional properties of extruded snack foods developed from food-by-products. *Journal of Food Engineering*, 86(1), 122-132.
- Yan, J., Zhao, J., Yang, R., & Zhao, W. (2019). Bioactive peptides with antidiabetic properties: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1909-1919.
- Yan, Q. J., Huang, L. H., Sun, Q., Jiang, Z. Q., & Wu, X. (2015). Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chemistry*, 179, 290-295.
- Yan, Y., Kusalik, A. J., & Wu, F. X. (2017). NovoExD: *de novo* peptide sequencing for ETD/ECD spectra. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 14(2), 337-344.
- Yang, H. Y., Erdös, E. G., & Levin, Y. (1970). A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214(2), 374-376.
- Yeo, I., Lee, Y. J., Song, K., Jin, H. S., Lee, J. E., Kim, D., ... & Kang, N. J. (2018). Low-molecular weight keratins with anti-skin aging activity produced by anaerobic digestion of poultry feathers with *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Journal of Biotechnology*, 271, 17-25.

- Yongvanit, P., Pinlaor, S., & Bartsch, H. (2012). Oxidative and nitrative DNA damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. *Parasitology International*, 61(1), 130-135.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., Cheng, H., & Maleki, S. (2011). Enzymatic treatment of peanut kernels to reduce allergen levels. *Food Chemistry*, 127(3), 1014-1022.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., & Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry*, 135(3), 2078-2085.
- Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Anwar, F., & Saari, N. (2012). Production of defatted palm kernel cake protein hydrolysate as a valuable source of natural antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8097-8111.
- Zarei, M., Ghanbari, R., Tajabadi, N., Abdul-Hamid, A., Bakar, F. A., & Saari, N. (2016). Generation, fractionation, and characterization of iron-chelating protein hydrolysate from palm kernel cake proteins. *Journal of Food Science*, 81(2), C341-C347.
- Zeng, M., Cui, W., Zhao, Y., Liu, Z., Dong, S., & Guo, Y. (2008). Antiviral active peptide from oyster. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(3), 307-312.
- Zhang, C., Liu, H., Chen, S., & Luo, Y. (2018). Evaluating the effects of IADHFL on inhibiting DPP-IV activity and expression in Caco-2 cells and contributing to the amount of insulin released from INS-1 cells *in vitro*. *Food & Function*, 9(4), 2240-2250.
- Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 521-527.
- Zhou, P., Yang, C., Ren, Y., Wang, C., & Tian, F. (2013). What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chemistry*, 141(3), 2967-2973.

- Zhu, H., Wang, X., Wallack, M., Li, H., Carreras, I., Dedeoglu, A., ... & Qiu, W. Q. (2015). Intraperitoneal injection of the pancreatic peptide amylin potently reduces behavioral impairment and brain amyloid pathology in murine models of Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 20(2), 252-262.
- Zhu, K. X., Sun, X. H., & Zhou, H. M. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- Zhuang, H., Tang, N., Dong, S. T., Sun, B., & Liu, J. B. (2013). Optimisation of antioxidant peptide preparation from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3264-3270.
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ayşe Gülden GÖKSU

ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans, 2021, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Gıda Mühendisliği (tam burslu)

Lisans, 2016, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Psikoloji (çift anadal/tam burslu)

Lisans, 2015, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Gıda Mühendisliği (tam burslu)

Lise, 2010, Sivas Prof. Dr. Necati Erşen Anadolu Öğretmen Lisesi

YAYINLAR

Pehlivanoğlu, H., **Göksu, A. G.**, Sancak, E., & Çakır, B. (2018, Kasım). Farklı Markalardaki Bebek Mamalarının (0-6 Ay) Fizikokimyasal Özelliklerine Yönelik Araştırmalar. International Conference on Food, Nutrition and Dietetics, Gastronomy Research, 28-30 Kasım 2018.

Göksu, A. G., Çakır, B., & Gülseren, İ. (2020, Ekim). Valorization of Bioactive Hazelnut Peptides in Industrially Processed Hazelnut Paste and Spread Products. NIZO Plant Protein Functionality Conference, 21-22 October 2020, Online.

Zent, İ., **Göksu, A. G.**, Çakır, B., & Gülseren, İ. (2021). Linking collective *in vitro* to individual *in silico* peptide bioactivity through mass spectrometry (LC-Q-TOF/MS) based sequence identification: the case of black cumin protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 664-674.